



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

CÉLULAS ESTAMINAIS DA POLPA EM REGENERAÇÃO TECIDULAR DENTÁRIA

Trabalho submetido por
Rita Diogo Ribeiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Outubro de 2014



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA

CÉLULAS ESTAMINAIS DA POLPA EM REGENERAÇÃO TECIDULAR DENTÁRIA

Trabalho submetido por
Rita Diogo Ribeiro
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

Trabalho orientado por
Prof. Doutora Isabel Barahona

Outubro de 2014

AGRADECIMENTOS

À Prof. Doutora Isabel Barahona, pelo rigor, exigência e cordialidade demonstrados ao longo da realização deste trabalho.

À minha família, pela liberdade, confiança e oportunidades que me proporcionaram ao longo da vida.

Aos meus amigos, pela sensatez e dedicação.

RESUMO

Nesta dissertação vão-se descrever os avanços mais recentes sobre a utilização de células estaminais da polpa dentária para regeneração de dentina e polpa em modelos animais. Estes avanços incluem os métodos utilizados com sucesso, nomeadamente os dos processos de recolha, cultura e transplante das células estaminais. Além disso, vamos realçar os trabalhos publicados que mostram que as hDPSC têm capacidade de induzir a formação de odontoblastos funcionais e gerar o complexo pulpo-dentinário *in vivo*, e que as hSHED são uma alternativa viável para a geração de dentina *in vivo*, mas isoladamente não são capazes de formar o complexo pulpo-dentinário. O uso de células estaminais da polpa é importante porque permitirá terapêuticas em que as funções tecidulares se mantêm. Finalmente, terminamos com a discussão sobre a viabilidade de utilização destas tecnologias.

Palavras-chave: complexo pulpo-dentinário, DPSC, odontoblasto, regeneração, SHED.

ABSTRACT

In this dissertation will be describe the latest advances in the use of stem cells from dental pulp to regeneration of dentin and pulp in animal models. These advances include the methods used successfully, in particular the processes of collection, culture and transplantation of stem cells. Furthermore, we highlight the published work showing that hDPSC have the ability to induce the formation of functional odontoblasts and generate the pulp-dentin complex *in vivo*, and that hSHED are a viable alternative for the generation of dentin *in vivo* but alone are not capable to form the pulp-dentin complex. The use of stem cells from the pulp is important because it allows the tissue treatment in which functions are maintained. Finally, we end with a discussion on the feasibility of using these technologies.

Keywords: dentin-pulp complex, DPSC, odontoblast, regeneration, SHED.

ÍNDICE GERAL

I. INTRODUÇÃO	17
II. DESENVOLVIMENTO.....	18
1. SC, a célula estaminal.	18
1.1. ASC, a célula estaminal adulta	20
1.2. MSC, a célula estaminal mesenquimatosa	20
1.3. A célula estaminal da polpa dentária.....	22
1.3.1. DPSC, a célula estaminal da polpa de dentes definitivos.....	22
1.3.2. SHED, a célula estaminal da polpa de dentes decíduos esfoliados.....	24
2. Engenharia tecidual.....	26
2.1. Isolamento	26
2.2. Cultura.....	28
2.3. Scaffolds	29
2.3.1. Scaffolds porosos pré-fabricados	32
2.3.2. Scaffolds de ECM sem células	33
2.3.3. Scaffolds de ECM com células (lâmina)	33
2.3.4. Hidrogéis com células encapsuladas	33
2.3.5. Scaffolds Naturais	35
2.3.6. Scaffolds Sintéticos	36
2.3.7. Scaffolds Híbridos.....	38
2.4. Factores.....	38
2.5. Transplante das SC dentárias /Implante <i>in vivo</i>	39
3. Investigações recentes com DPSC.....	40
3.1. Por Gronthos, S., <i>et al.</i> , em 2000	40
3.2. Por Iohara, K., <i>et al.</i> , em 2004.....	42
3.3. Por Huang, G., <i>et al.</i> , em 2009	42
3.4. Por Alge, D., <i>et al.</i> , em 2010	47
3.5. Por Balic, A., <i>et al.</i> , em 2010.....	50
3.6. Por Kawashima, N., em 2012	53
3.7. Por Atari, M., <i>et al.</i> , em 2012	53
3.8. Por Wang, Y., <i>et al.</i> , em 2013.....	55
3.9. Por Attar, A., <i>et al.</i> , em 2013.....	59
3.10. Por Horibe, H., <i>et al.</i> , em 2013	60

3.11. Por Iohara, K., <i>et al.</i> , em 2013	60
3.12. Por Zhou, Y., <i>et al.</i> , em 2014.....	65
3.13. Por Ueda, M., <i>et al.</i> , em 2014	65
3.14. Por Han, N., <i>et al.</i> , em 2014	67
3.15. Por Choi, Y.-A., <i>et al.</i> , 2014	68
4. Investigações recentes com SHED	69
4.1. Por Miura, M., <i>et al.</i> , em 2003.....	69
4.2. Por Shi, S., <i>et al.</i> , em 2005	70
4.3. Por Cordeiro, M., <i>et al.</i> , em 2008	71
4.4. Por Casagrande, L., <i>et al.</i> , em 2009	73
4.5. Por Nakamura, S., <i>et al.</i> , em 2009	75
4.6. Por Coppe, C., <i>et al.</i> , em 2009	76
4.7. Por Hara, K., <i>et al.</i> , em 2011	76
4.8. Por Zheng, Y., <i>et al.</i> , em 2012.....	77
4.9. Por Rosa, V., <i>et al.</i> , em 2013	79
4.10. Por Yu, S., <i>et al.</i> , em 2014.....	83
5. Criopreservação e Bancos de células estaminais dentárias	85
5.1. Investigação desenvolvida por Ma, L., <i>et al.</i> , em 2012.....	85
III. CONCLUSÃO	88
1. Viabilidade e perspectivas da utilização de células estaminais dentárias	89
IV. BIBLIOGRAFIA	90

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do padrão de divisão celular das SC. A divisão simétrica permite a auto-renovação celular (à esquerda) e a divisão assimétrica origina células especializadas (à direita).	18
Figura 2. Origem da ESC (totipotente se originária do ovo, pluripotente se originária do blastocisto) e da ASC (multipotente, onde se incluem as SC originárias do cordão umbilical).....	19
Figura 3. MSC da cavidade oral.	21
Figura 4. A polpa dentária possui uma população de MSC	22
Figura 5. A. Exposição de tecido pulpar (indicado pela seta), através de corte horizontal realizado do dente, para permitir a recolha de DPSC	23
Figura 6. Isolamento das SC.....	26
Figura 7. As SC são colocadas em scaffold ricos em factores e nutrientes que permitem a regeneração, num meio semelhante ao natural	31
Figura 8. Características dos quatro diferentes tipos de scaffold	32
Figura 9. B. Imagem radiográfica de um implante de SC dentárias (seta) no porco <i>in vivo</i>	39
Figura 10. Um rato imunocomprometido serviu de modelo subcutâneo para regeneração de polpa e dentina a partir de hDPSC.....	42
Figura 11. Comparação da indução odontogénica, adipogénica e neurogénica entre as DPSC e as BMSC	44
Figura 12. A.-B. Análise histológica do grupo de controlo	45
Figura 13. Análise histológica da regeneração de dentina e polpa <i>in vivo</i> usando DPSC	46
Figura 14. Proliferação de novas culturas de DPSC e BMSC.....	47
Figura 15. A. e B. Coloração positiva com alizarina das DPSC e das BMSC.....	48
Figura 16. As DPSC têm um tempo de duplicação significativamente mais curto do que as BMSC.....	48
Figura 17. As DPSC geraram significativamente mais colónias e contêm significativamente maior potencial clonal do que as BMSC.....	49
Figura 18.C. Actividade da fosfatase alcalina das DPSC e das BMSC.....	49
Figura 19. Expressão odontogénica das DPSC e das BMSC.	50

Figura 20. Comparação da mineralização <i>in vitro</i> das rDPSC (ratos com 5 a 7 semanas de idade, P5-7; e ratos com 18 a 21 semanas de idade, P18-21), das rBMSC e dos osteoblastos nos dias 7, 10, 14 e 21 de cultura.	51
Figura 21. F. Transplantes das hDPSC para um rato imunocomprometido e formação de um teratoma ao fim de 5 semanas	52
Figura 22. D. Análise morfológica das hDPSC examinadas por microscopia electrónica de transmissão	53
Figura 23. Análise do fenótipo das hDPSC por microscopia confocal.....	53
Figura 24. Caracterização das cDPSCs dos Beagles	55
Figura 25. Radiografias pré e pós-operatórias.....	57
Figura 26. Avaliação histológica da regeneração de tecido pulpar com HE.....	58
Figura 27. Comparação da formação de colónias pelas DPSC isoladas de polpa saudável e polpa diagnosticada com pulpíte.....	58
Figura 28. Comparação da diferenciação celular das DPSC isoladas de polpa saudável e polpa diagnosticada com pulpíte.....	59
Figura 29. A.-C. Isolamentos das DPSC de um cão adulto	60
Figura 30.A.-E. Regeneração do tecido pulpar depois do transplante das DPSC com G-CSF para dentes de cão após pulpectomia	61
Figura 31. R. e S. Actividade proliferativa (R) e actividade migratória (S) das DPSC superior às das células da polpa, com G-SCF	62
Figura 32. D. Expressão de marcadores celulares e factores tróficos pelas cDPSC com G-SCF.....	62
Figura 33. K.-T. Análise histológica da região periapical e gráfico da evolução do diâmetro apical.....	62
Figura 34. Efeito combinatório das DPSC e do G-CSF na regeneração do tecido pulpar	63
Figura 35. Diagrama dos efeitos do G-CSF e outros factores tróficos na regeneração de tecido pulpar e dentinário	64
Figura 36. A. O tratamento com TNF- α aumenta o número de DPSC marcadas positivamente para o STRO-1, o CD146 e o SSEA-4	65
Figura 37. C. O tratamento com TNF- α aumenta a expressão de OCT-4 e NANOG pelas DPSC	65
Figura 38. B. Coloração imunofluorescente para a β -catenina, Runx2, DAPI e Merge	66

Figura 39. Expressão aumentada de marcadores celulares por acumulação de β -Catenina com tratamento de LiCl	67
Figura 40. Diferenciação vascular e endotelial das SHED	71
Figura 41. C. Taxa de proliferação das três amostras de SHED e do grupo de controlo (scaffold).....	72
Figura 42. C. Expressão de marcadores odontogénicos pelas amostras de SHED <i>in vivo</i>	73
Figura 43. B. Expressão de marcadores odontogénicos pelas amostras de SHED <i>in vitro</i>	73
Figura 44. Comparação da expressão de alguns marcadores odontogénicos pelas hDPSC e hSHED.....	74
Figura 45. A.-E. Análise PCR da expressão de BMP-2, BMP-4, RUNX2, OCN e DSPP pelas SHED e pelas BMSC durante 21 dias de indução odontogénica.....	76
Figura 46. Análise de SHED de porco em dentina regenerada	77
Figura 47. Análise histológica da regeneração de dentina pelas SHED de porco.....	77
Figura 48. A. Morfologia e proliferação <i>in vitro</i> das SHED num scaffold injectável...	79
Figura 49. B. Proliferação das SHED ao longo dos setes dias de cultura quando misturadas com <i>Puramatrix</i> e com <i>rhCollagen tipo I</i>	79
Figura 50. Expressão de marcadores osteogénicos: DSPP, DMP-1 e MEPE, pelas SHED em <i>Puramatrix</i> e pelas SHED em <i>rhColaggen type I</i> , nos dias 7, 14, 21 e 28 de cultura <i>in vitro</i>	80
Figura 51. A. Caracterização das SHED nos scaffold <i>Puramatrix</i> e <i>rhCollagen</i> em comparação com o grupo de controlo (polpa humana).	80
Figura 52. Caracterização das SHED injectadas nos canais radiculares humanos e consequente transplante para um rato imunocomprometido	82
Figura 53. B. Formação de tecidos mineralizados pelas SHED-fresh e pelas SHED-crio	85
Figura 54. J. As SHED-crio conseguiram manter uma actividade de telomerase semelhança às SHED-fresh	85
Figura 55. Comparação da expressão de marcadores de diferenciação osteogénica e odontogénica pelas SHED-crio e SHED-fresh	86

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Marcadores celulares das MSC da polpa dentária	25
Tabela 2. Potenciais de proliferação e de diferenciação das MSC da polpa dentária	25
Tabela 3. Funções da ECM nos tecidos nativos e dos scaffolds nos tecidos envolvidos no processo de engenharia tecidual.	30
Tabela 4. Características dos diferentes tipos de scaffolds	34
Tabela 5. Materiais utilizados na construção de scaffolds	35
Tabela 6. Avaliação clínicas dos 3 grupos, 24 semanas pós-cultura.	57
Tabela 7. Avaliação radiográfica dos 3 grupos	58
Tabela 8. Comparação da expressão de marcadores de superfície entre as DPSC e as células da polpa.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS

ALP – Fosfatase alcalina.

ASC – Célula estaminal adulta.

BBX – Factor de transcrição homólogo Bobby-Sox.

BMP - Proteína morfogénica do osso.

BMSC – Célula estaminal da medula óssea.

CD – Antigénio de diferenciação celular.

CFU – Colónia celular.

DFSC – Célula estaminal do folículo dentário.

DPSC – Célula estaminal da polpa de dentes definitivos.

DSPP – Sialofosfoproteína da dentina.

cDPSC - Célula estaminal da polpa dentária canina.

hDPSC – Célula estaminal da polpa dentária humana.

rDPSC – Célula estaminal da polpa dentária de rato.

ECM – Matriz extracelular.

ESC – Célula estaminal embrionária.

FACS – Separador automático de células por fluorescência.

FBS – Soro de bovino fetal.

FGF - Factor de crescimento fibroblástico.

GFP – Proteína verde fluorescente.

G-SCF – Factor de estimulação de formação de colónias de granulócito.

HA – Hidroxiapatite.

HE – Hematoxilina-eosina.

MACS – Separador automático de células por activação magnética.

MSC – Célula estaminal mesenquimatosa.

MTA – Mineral trióxido agregado.

NANOG – Factor de transcrição das ESC.

NES – Nestin, proteína do filamento intermédio tipo IV.

NF – Nanofibroso.

OCN – Osteocalcina.

OCT-4 – Factor de transição Octamer-4.

PDLSC – Célula estaminal do ligamento periodontal.

PGA – Ácido glicólico.

PLA – Ácido láctico.

PLGA – Ácido polilático-coglicólido.

RUNX2 – Factor de transcrição Runx2.

SC – Célula estaminal.

SCAP – Célula estaminal da papila apical.

SCID – Imunodeficiência combinada severa.

SGSC – Célula estaminal da glândula salivar.

SHED – Célula estaminal da polpa de dentes decíduos esfoliados.

SOX2 – Factor de transcrição das ESC.

SSEA-4 – Antigénio do estadio embrionário 4.

STRO-1 – Marcador celular de percursores do estroma (MSC).

SW – Sólido.

β -TCP – Fosfato de tricálcio - beta.

TGF- β – Factor de crescimento transformante - beta.

TGPC – Célula estaminal do gérmen dentário.

TNF- α – Factor de necrose tumoral - alfa.

VEGF - Factor de crescimento endotelial vascular.

I. INTRODUÇÃO

A medicina dentária utiliza procedimentos que substituem o tecido dentário lesado (esmalte e complexo pulpo-dentinário) por materiais que permitem a manutenção das funções básicas do dente como a mastigação, a fala e a estética facial, revelando-se porém ineficazes na restituição das suas funções biológicas (Shilpa, P.S., *et al.*, 2013).

A patologia da cavidade oral¹ compromete muitas vezes a auto-estima e a qualidade de vida dos doentes, sendo igualmente objectivo da medicina dentária eliminar o sofrimento psicológico a ela associada (Yuan, Z., *et al.*, 2011).

Durante o desenvolvimento dentário, as interações entre as células epiteliais do esmalte e as células mesenquimais da papila dentária levam à formação de odontoblastos e ameloblastos capazes de produzir matrizes mineralizadas especializadas, a dentina e o esmalte, respectivamente. Uma vez formadas, estas matrizes não têm capacidade para se remodelarem, ao contrário do osso que se remodela ao longo da sua vida pós-natal. Em resposta a mecanismos erusivos e/ou infecção bacteriana, os dentes erupcionados formam dentina secundária ou reparadora a partir de odontoblastos que se diferenciam a partir de populações precursoras presentes no tecido pulpar (Gronthos, S., *et al.*, 2000).

A prova mais convincente de que é possível a utilização de células estaminais para regeneração, é o processo natural e autólogo de regeneração em que as SC são utilizadas fisiologicamente para reparar uma lesão tecidular. É este processo, estudado há anos, que sustenta de forma convincente a investigação necessária que está a ser elaborada para guiar o desenvolvimento de novas abordagens biomiméticas regenerativas (Machado, E., *et al.*, 2011).

As células estaminais poderão trazer progressos no tratamento médico. Na medicina dentária regenerativa, a utilização de células estaminais reflete o intuito de se realizarem tratamentos de forma cada vez mais eficaz, pois pretende-se tratar um defeito tecidular dentário restaurando a sua forma original e funções, utilizando substitutos biológicos (Volponi, A., *et al.*, 2010). Actualmente, a investigação com células estaminais dentárias tem-se focado na regeneração do complexo pulpo-dentinário (Shilpa, P.S., *et al.*, 2013).

¹ A cárie dentária continua a ser um problema de saúde oral nos países industrializados, afectando entre 60 a 90% dos adultos e das crianças em idade escolar. (http://www.who.int/oral_health/disease_burden/global/en/)

II. DESENVOLVIMENTO

1. SC, a célula estaminal

A célula estaminal (SC) possui características únicas que a diferenciam de todas as outras, a sua capacidade de auto-renovação garantida por divisão simétrica que origina duas células-filhas idênticas a si² e lhe permite preservar uma população celular indiferenciada que mantém o número de células estaminais constante, ou seja, origina células especializadas em renovação tecidual por um período de tempo indefinido (Lodish, H., *et al.*, 2005). As SC também são capazes de originar, por divisão assimétrica, uma célula-filha idêntica a si e uma célula estaminal diferenciada que estabiliza a produção de células com capacidades mais restritas (como dividir-se por um período de tempo limitado ou diferenciar-se em menos tipos celulares) que entram posteriormente em divisão. A SC apresenta assim diferentes padrões de divisão celular, uma vez que pode dividir-se simétrica ou assimetricamente (Figura 1.) (Singh, K., *et al.*, 2012).

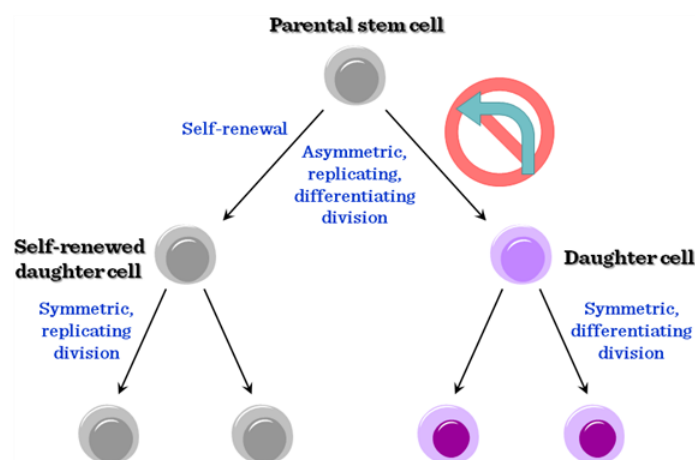


Figura 1. Esquema do padrão de divisão celular das SC. A divisão simétrica permite a auto-renovação celular (à esquerda) e a divisão assimétrica origina células especializadas (à direita) (http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_3D_en_book/ch01s02.html).

² Ao contrário do que acontece com as células precursoras comuns que geram duas células-filhas idênticas mas diferentes da célula precursora original (Lodish, H., *et al.*, 2005).

A SC é classificada como embrionária ou adulta em função da sua origem. A célula estaminal embrionária (ESC) origina-se a partir de algumas células do blastocisto (Figura 2.) (Hacking, S.A., *et al.*, 2009), que têm capacidade para formar todos os tipos celulares excepto os anexos embrionários, mas a sua utilização no *setting* clínico está associada a problemas éticos (Yildirim, S., *et al.*, 2011).

A célula estaminal adulta (ASC) é obtida a partir de tecidos de linhagem mesenquimatosa como a medula óssea, o próprio cordão umbilical, a placenta, a polpa dentária, entre outros (Figura 2.) (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012).

As SC têm capacidades proliferativas diferentes dependendo dos tipos celulares; a capacidade de diferenciação também varia podendo ser uma célula unipotente e dividir-se para formar uma célula igual a si própria e outra célula que apenas pode dar origem a um tipo celular; pode ser multipotente (ASC) ou pluripotente (ESC) com capacidade de gerar vários tipos de células mas não todos, ou pode ainda ser uma célula totipotente (ovo), capaz de formar todos os tecidos (Lodish, H., *et al.*, 2005).

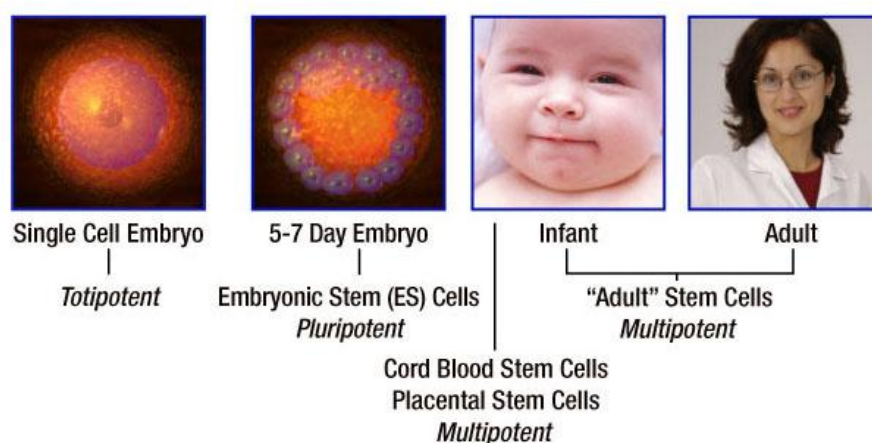


Figura 2. Origem da ESC (totipotente se originária do ovo, pluripotente se originária do blastocisto) e da ASC (multipotente, onde se incluem as SC originárias do cordão umbilical) (<http://www.pall.com/main/medical/frequently-asked-questions-cell-therapy-38848.page>).

Depois de vários anos de investigação, não existem ainda tratamentos nem testes aprovados que usem células estaminais embrionárias humanas, mas pelas capacidades combinadas de expansão sem limites e pluripotência, as células estaminais embrionárias continuam a ser uma fonte potencial de medicina regenerativa, uma vez que teoricamente permitiriam a substituição de tecidos depois da sua perda por doença (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012).

1.1. ASC, a célula estaminal adulta

A célula estaminal adulta tem uma capacidade de diferenciação mais restrita do que a célula estaminal embrionária, podendo dividir-se apenas em alguns tipos celulares, como as células estaminais mesenquimatosas (MSC) e as células estaminais hematopoiéticas (Shilpa, P. S., *et al.*, 2013).

As células estaminais adultas conseguem auto-renovar-se e gerar um novo tecido durante toda a vida (Singh, K., *et al.*, 2012), podem ser recolhidas de um indivíduo que precise de efectuar um tratamento médico garantindo a possibilidade de fazer um transplante autólogo, evitando reacções imunológicas de rejeição (Demarco, F., *et al.*, 2011).

Os animais apresentam células estaminais adultas em vários tecidos, e até no cérebro onde ocorrem poucas divisões celulares existe uma população de células estaminais (Lodish, H., *et al.*, 2005).

As ASC têm sido extensamente estudadas nos campos da medicina e da medicina dentária (Shilpa, P. S., *et al.*, 2013), porque a sua utilização não levanta problemas éticos e, em princípio, a probabilidade de virem a desenvolver teratomas é baixa. No entanto, recentemente foi descrito o aparecimento de teratoma associado à utilização de DPSC (Atari, M., *et al.*, 2012).

1.2. MSC, a célula estaminal mesenquimatosa

A MSC pode diferenciar-se em todas as células dos tecidos conjuntivos (Machado, E., *et al.*, 2011), osteoblastos, condrócitos e adipócitos (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012). Para além disso, as MSC podem ser criopreservadas para posterior utilização e expressam marcadores celulares como o STRO-1, o CD73, o CD90 e o CD105 (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012).

As MSC mais estudadas até hoje são as BMSC e o seu potencial de diferenciação é muito grande, nomeadamente podem-se diferenciar em osteoblastos, condrócitos, adipócitos e outras células do tecido conjuntivo, para além de células do tecido muscular e neural. Caracterizam-se por terem uma elevada capacidade proliferativa em múltiplas linhagens mesenquimais (SC multipotentes). A diferenciação tecidual das BMSC depende do seu estado de diferenciação e do microambiente em que estão inseridas. As BMSC são precursores conhecidos de osteoblastos. Está bem

documentado que osteoprogenitores podem ser isolados por aspiração de medula óssea através da sua capacidade para aderirem a um substrato e começarem a proliferar após estimulação apropriada. Cada colônia, em princípio, é originada a partir de uma única célula progenitora (CFU) e dispõe de uma alargada variação de morfologias e potencial de crescimento (Gronthos, S., *et al.*, 2000).

Actualmente não há consenso sobre qual o melhor tipo de MSC para utilizar na regeneração dentária, se as células estaminais da medula óssea (BMSC) ou as células estaminais da polpa dentária, embora se reconheça que há diferenças na capacidade odontogénica destes dois tipos de SC (Shilpa, P. S., *et al.*, 2013).

Nepal *et al.* demonstraram que as DPSC apresentam maior capacidade para formar colônias (CFU) do que as BMSC e sobrevivem durante mais tempo, e têm uma taxa de proliferação maior. O seu potencial é diferente do das BMSC, sendo superior a tendência para se diferenciarem em linhagens odontogénicas e osteogénicas (Machado, E., *et al.*, 2011). Além disso, o isolamento de BMSC implica um procedimento invasivo, tornando-se impraticável na especialidade de medicina dentária (Nakahara, T., 2011).

Os tecidos orais têm sido usados para isolar e expandir MSC, com a recolha de células estaminais dentárias a receber atenção e a sugerir a transferência dos procedimentos laboratoriais para a prática clínica, devido às suas potenciais aplicações (Machado, E., *et al.*, 2011). As SC dentárias são MSC imaturas, não-especializadas, que derivam da crista neural; e, até à data, foram isoladas a partir da polpa dentária (DPSC e SHED), do ligamento periodontal (PDLSC), do folículo dentário (DFSC) e da papila apical (SCAP) (Figura 3.) (Shilpa, P. S., *et al.*, 2013).

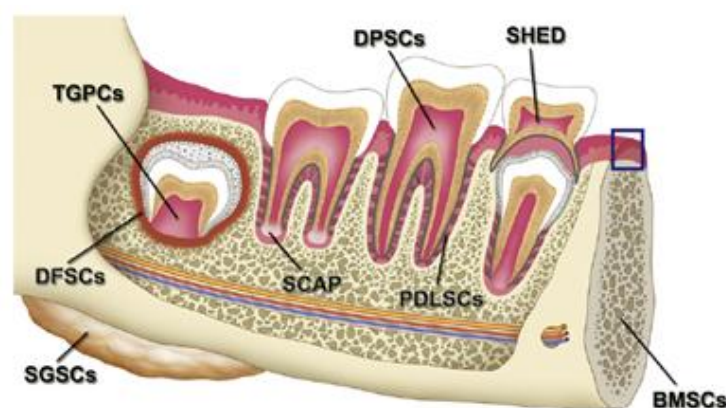


Figura 3. MSC da cavidade oral. TGPC, SC do gérmen dentário. SGSC, SC da glândula salivar (Egusa, H., *et al.*, 2012).

1.3. A célula estaminal da polpa dentária

A polpa dentária possui diferentes populações celulares como os fibroblastos, com potencial de diferenciação em odontoblastos, e as células estaminais da polpa (Figura 4.), MSC multipotentes (com potencial de diferenciação em odontoblastos, osteoblastos, adipócitos e células nervosas) que podem ser obtidas da polpa de dentes definitivos (DPSC) e da polpa de dentes decíduos esfoliados (SHED) (Kawashima, N., 2012).

A primeira vez que se descreveu a presença de SC em tecidos dentários foi há mais de 10 anos atrás (Kawashima, N., 2012). Gronthos e a sua equipa em 2000 foram os primeiros investigadores a isolar uma ASC de um tecido dentário e que confirmaram que as DPSC possuíam as características mínimas para serem consideradas MSC (Gronthos, S., *et al.*, 2000). Em 2003, foi a equipa de Miura que mostrou ser possível isolar SHED da polpa de dentes decíduos (Miura, M., *et al.*, 2003).

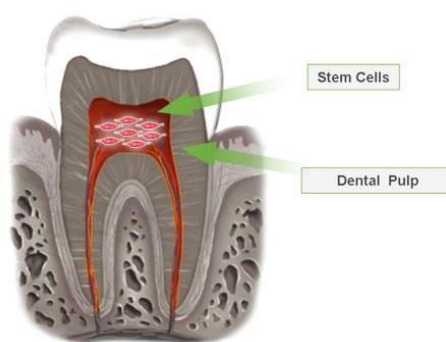


Figura 4. A polpa dentária possui uma população de MSC (<http://akshaylaserdentalcare.com/dental-stem-cell>).

1.3.1. DPSC, a célula estaminal da polpa de dentes definitivos

Foi a partir da analogia entre as células de colónias de DPSC e os progenitores de medula óssea das colónias de BMSC, que Gronthos e a sua equipa identificaram um novo tipo de SC, caracterizadas por uma morfologia típica de fibroblasto. Em 2000, Gronthos *et al.* isolaram as células estaminais da polpa dentária do adulto com capacidade de proliferação e de diferenciação em vários tipos celulares especializados (Gronthos, S., *et al.*, 2000), como: odontoblastos, osteoblastos, adipócitos e células neurais. As DPSC formam um tecido idêntico à polpa vascularizada, rodeado por odontoblastos que expressam marcadores como o CD73, o CD90 e o CD105, e que são

capazes de produzir túbulos dentinários semelhantes aos encontrados na dentina original (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012). As DPSC caracterizam-se por serem grandes e arredondadas, possuírem citoplasma abundante e um núcleo central (Rai, S., *et al.*, 2013).

Uma vez que os dentes exibem uma capacidade limitada para responder a estímulos nocivos, as DPSC representam uma fonte de substituição das células lesadas (Volponi, A., *et al.*, 2010). Foi também demonstrado que as células estaminais dentárias podem trocar de linhagem e formar tecido ectodérmico como por exemplo neurónios (Shilpa, P. S., *et al.*, 2013).

As DPSC podem ser úteis para a regeneração de tecidos moles como a polpa mas também de tecidos mineralizados como a dentina (DiPietro, L., 2012). Investigações recentes têm demonstrado que as DPSC têm potencial de diferenciação em odontoblastos típicos formando túbulos dentinários (Kawashima, N., 2012) e em vasos sanguíneos funcionais *in vivo*, o que possibilita a sua utilização para a regeneração do complexo pulpo-dentinário, providenciando uma rede vascular necessária à formação do tecido dentário *de novo* (Casagrande, L., *et al.*, 2011). Um dos desafios críticos da regeneração pulpar é precisamente conseguir gerar uma rede vascular funcional tendo em conta as restrições anatómicas da polpa, visto que toda a vascularização dentária tem acesso radicular apenas pelo forâmen apical (Casagrande, L., *et al.*, 2011).

As DPSC isoladas da polpa incluem precursores capazes de formar odontoblastos, sob sinais apropriados como o hidróxido de cálcio ou o fosfato de cálcio, materiais usados para protecção pulpar (Rai, S., *et al.*, 2013). Os odontoblastos são células especializadas que produzem a matriz de colagénio e sintetizam proteínas não-colagénicas que afectam a estrutura e a mineralização dentinária. Os prolongamentos citoplasmáticos dos odontoblastos estendem-se pelos túbulos dentinários formando uma camada na interface pré-dentina-polpa, enquanto que os seus corpos se dispõem na camada mais externa da periferia do tecido pulpar (Summitt, J., *et al.*, 2006).

As DPSC podem ser isoladas de diversas fontes dentárias e por diferentes motivos, como por exemplo: sisos, por motivos profiláticos, pré-molares, por motivos ortodônticos, dentes supranumerários (La Noce, M., *et al.*, 2014) cuja taxa de incidência varia entre 0,45 e 3% (Huang, A., *et al.*, 2009), dentes que sofreram fraturas corono-radiculares complicadas com exposição pulpar (Kawashima, N., 2012) cuja taxa de incidência varia entre 4,6 e 24,4% (Huang, A., *et al.*, 2009), entre outros (Figura 5.).

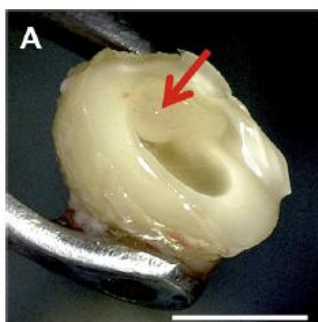


Figura 5. A. Exposição de tecido pulpar (indicado pela seta), através de corte horizontal realizado no dente, para permitir a recolha de DPSC (Egusa, H., *et al.*, 2012).

As DPSC já foram isoladas de diferentes organismos, não só de humanos mas também de animais, como: o rato, a ovelha, o porco (La Noce, M., *et al.*, 2014), o cão (Kawashima, N., 2012), e o coelho (Kawashima, N., 2012).

1.3.2. SHED, a célula estaminal da polpa de dentes decíduos esfoliados

As SHED com as suas capacidades proliferativa e de diferenciação elevadas, podem ser uma fonte alternativa de SC dentárias para utilização em medicina dentária regenerativa (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012).

De facto, a polpa de dentes decíduos é uma boa fonte de ASC multipotentes (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012) porque para além dos métodos de recolha das SHED serem considerados não-invasivos, a polpa de dentes decíduos possui uma grande quantidade de células estaminais (Taka Nakahara, 2011). As populações de SHED podem ser obtidas facilmente, quer por perda natural quer por remoção cirúrgica de dentes.

As SHED diferem das DPSC diferem quanto à taxa de crescimento em cultura, à expressão de marcadores genéticos e à capacidade de diferenciação celular (Volponi, A., *et al.*, 2010) (Tabela 1. e 2.).

Tabela 1. Marcadores celulares das MSC da polpa dentária (Egusa, H., *et al.*, 2012).

SC	Expressão positiva de antígenos CD	Expressão negativa de antígenos CD	Outros marcadores representativos
DPSC	CD9, CD10, CD13, CD29, CD44, CD49d, CD59, CD73, CD90, CD105, CD106, CD146, CD166	CD14, CD31, CD34, CD45, CD117, CD133	STRO-1, NES
SHED	CD13, CD44, CD73, CD90, CD105, CD146	CD14, CD19, CD34, CD43, CD45	STRO-1, OCT-4, NANOG, NES, SSEA-3, SSEA-4

Tabela 2. Potenciais de proliferação e de diferenciação das MSC da polpa dentária (Egusa, H., *et al.*, 2012).

SC	Potencial de diferenciação	Capacidade de diferenciação <i>in vitro</i>	Capacidade de formação de tecidos <i>in vivo</i>
DPSC	> 120	Dentária (odontoblastos) Mesoderme (osteoblastos, adipócitos, condrócitos, miócitos) Ectoderme (neurónios)	Dentária (dentina, polpa) Mesoderme (tecido adiposo, músculo)
SHED	> 140	Dentária (odontoblastos) Mesoderme (osteoblastos, adipócitos, condrócitos, miócitos, células endoteliais) Ectoderme (neurónios)	Dentária (dentina) Mesoderme (osso, vasos sanguíneos)

2. Engenharia tecidual

A investigação com células estaminais recorre à engenharia tecidual, um campo multidisciplinar emergente cujo objectivo é transpor para aplicação clínica a reparação ou regeneração de órgãos e tecidos, favorecendo o processo de remodelação tecidual através do desenvolvimento de biomateriais (construções bioartificiais) e uso de células manipuladas.

As capacidades únicas de auto-renovação e plasticidade, tornam as células estaminais particularmente adequadas para aplicações regenerativas, com abundantes relatórios experimentais e investigações clínicas preliminares a substanciar o seu potencial uso. Nas aplicações de engenharia tecidual as MSC estão entre as populações de células mais usadas uma vez que há várias fontes de onde podem ser recolhidas e a vasta maioria dos tecidos relevantes na regeneração têm origem mesenquimatosa (Machado, E., *et al.*, 2011).

A engenharia tecidual comporta os processos de isolamento, cultura (as SC são mantidas sob condições que permitem a sua sobrevivência, expansão e diferenciação (Lodish, H., *et al.*, 2005)) e posterior implante em modelo *in vivo* das células estaminais dentárias para regeneração tecidual dentária (Khademhosseini A., *et al.*, 2006).

O desenvolvimento destes processos será exposto em seguida, juntamente com os resultados de alguns trabalhos recentemente publicados sobre a utilização da engenharia tecidual para regeneração dentária.

2.1. Isolamento

Para preparar as SC para cultura, as ligações entre estas e a matriz extracelular tem que ser rompida. Assim, transfere-se um pedaço de um tecido combinado com proteases, como a colagenase ou a tripsina, e um agente quelante, (Lodish, H., *et al.*, 2005) que sofrendo digestão enzimática permite separar as células do tecido (La Noce, M., *et al.*, 2014).

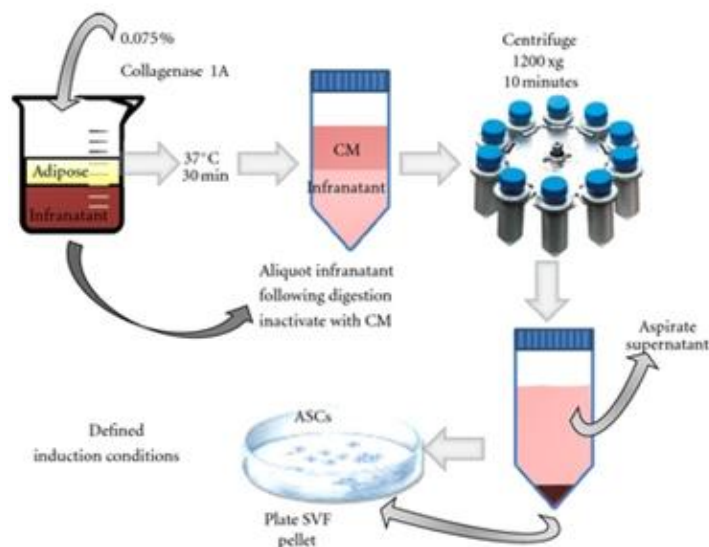


Figura 6. Isolamento das SC. Digestão enzimática de tecido adiposo por colagenase tipo I durante 30 minutos a 37°C seguida de centrifugação, posteriormente as ASC são colocadas numa placa de cultura sob condições que induzem proliferação. CM, células mesenquimais. SVF, fracção de estroma vascular. Infranata de tecido adiposo (<http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/713959.fig.001.jpg>).

Depois da separação celular por digestão enzimática, as células são colocadas numa placa com soro onde aderem à superfície e se ligam entre si (Lodish, H., *et al.*, 2005). Friedenstein *et al.*, foi o primeiro a descrever o isolamento das MSC através da capacidade selectiva das BMSC aderirem a um substrato, nomeadamente às placas de cultura, dando origem à formação de colónias de fibroblastos (Machado, E., *et al.*, 2011). A maioria das SC que aderem à superfície só se dividem por um período de tempo finito e depois param de crescer (Lodish, H., *et al.*, 2005).

As DPSC isoladas por tratamento enzimático formam CFU com densidades, tamanhos e morfologia diferentes, sugerindo que cada célula pode ter um potencial de proliferação ou diferenciação distinto, tal como reportado para as BMSC. Além disso, alguns marcadores específicos das células estaminais não são expressos de forma uniforme em todas as culturas de DPSC, sugerindo fortemente que esta população celular é heterogénea (Machado, E., *et al.*, 2011).

Depois da digestão enzimática, recorre-se a técnicas de separação de células por citometria de fluxo associada ao uso de biomarcadores específicos que permitem isolar

as SC por activação fluorescente (FACS), ou por activação magnética (MACS) (La Noce, M., *et al.*, 2014).

A citometria de fluxo por activação fluorescente permite separar misturas heterogéneas de células em dois ou mais recipientes, uma célula de cada vez, através da dispersão de luz fluorescente e específica de cada célula, num processo rápido e objectivo que permite não só separar fisicamente as células estaminais como quantificá-las. O FACS identifica as SC da polpa fluorescentes através dos seus marcadores celulares de *stemness*, por exemplo, o CD34⁺ e o CD117⁺, o que permite distingui-las das restantes células em cultura (La Noce, M., *et al.*, 2014).

A citometria de fluxo por activação magnética também permite separar várias populações celulares dependendo dos seus antígenos de superfície. A MACS consiste na incubação das células com partículas nanomagnéticas e anticorpos contra antígenos específicos que permitem a separação celular, uma vez que os anticorpos fazem com que as células que expressam um antígeno específico se juntem às nanopartículas magnéticas (Masthan, K.M.K., *et al.*, 2013).

2.2. Cultura

A cultura celular permite que um único tipo de células de uma população homogénea possa crescer em condições controladas que permitem o processo de clonagem. A principal desvantagem é que como não se encontram no seu ambiente natural, as células não são controladas por outras células e tecidos, o que pode afectar as suas propriedades. As SC dentárias precisam de muitos nutrientes específicos, de placas com coberturas especiais e de estar a uma temperatura de 37°C, em suma que o ambiente de cultura se aproxime o mais possível do ambiente natural, para que o processo de cultivo seja bem-sucedido. As culturas são mantidas em incubadoras com temperatura e taxa de humidade controladas, para reduzir a possível contaminação bacteriana ou fungicida, acrescentando-se também antibióticos ao meio de cultura (Lodish, H., *et al.*, 2005).

Para diminuir a contaminação os investigadores manipulam as SC em placas que proporcionam um meio sólido para adesão celular, com soro onde estão os factores de crescimento necessários para a proliferação celular. Na placa as SC secretam os componentes da matriz celular que aderem à superfície da placa, ligam-se e crescem na matriz secretada. Uma única SC pode originar colónias celulares, um conjunto de

milhares de células idênticas até 14 dias, de acordo com a sua taxa de crescimento (Lodish, H., *et al.*, 2005).

As DPSC devem ser cultivadas num meio semelhante ao microambiente dentário, com estímulos extracelulares, para desenvolverem os odontoblastos (Volponi, A., *et al.*, 2010). As DPSC de por exemplo um terceiro molar extraído necessitam de ser cultivadas e manipuladas *in vitro* para posteriormente se ter quantidade suficiente para efectuar o seu transplante para um modelo animal, o que para além da potencial contaminação patogénica e tumorigénese a longo prazo das células manipuladas, acarreta um custo elevado (Yildirim, S., *et al.*, 2011). Além disso, a diferenciação para odontoblastos apenas pode ser induzida sob certas condições, como a presença de dentina intacta (Yan, M., *et al.*, 2011).

2.3. Scaffolds

O scaffold é uma matriz ou suporte biomaterial cuja função principal é suportar a estrutura biomecânica das células estaminais nele inseridas, juntamente com proteínas bioactivas estimuladoras da proliferação, migração e diferenciação celulares, tenta recriar um microambiente tridimensional semelhante ao dos tecidos naturais (Rosa, V., *et al.*, 2012; Feng, R., *et al.*, 2013).

Intuitivamente o melhor scaffold é aquele constituído pela ECM do tecido hospedeiro no seu estado nativo. O scaffold pretende imitar as funções da ECM pelo menos de forma parcial, uma vez que as múltiplas funções, a composição complexa e a natureza dinâmica da ECM são difíceis de imitar de forma exacta. Isto depende não só da arquitectura (e constituição) do scaffold, como das suas características biológicas e mecânicas (Tabela 3.) (Chan, B., *et al.*, 2008).

Os scaffolds devem proporcionar o espaço necessário para a formação de tecido *de novo*, a vascularização e a remodelação, de modo a facilitar a integração do tecido após o implante no hospedeiro. A sua estrutura deve ser suficientemente porosa para permitir o transporte eficaz de nutrientes e metabolitos sem comprometer de forma significativa a estabilidade mecânica, uma vez que precisam de ser degradados à medida que se vai produzindo matriz *de novo*, após o implante no tecido receptor.

Para além de fornecerem suporte tanto às células endógenas como às células exógenas aplicadas de forma a que as primeiras se possam ligar, crescer e diferenciar em cultura *in vitro* e no implante *in vivo* (Chan, B., *et al.*, 2008).

Tabela 3. Funções da ECM nos tecidos nativos e dos scaffolds nos tecidos envolvidos no processo de engenharia tecidual.

Funções da ECM nos tecidos nativos	Funções análogas dos scaffolds nos tecidos envolvidos no processo de engenharia tecidual	Arquitectura e características biológicas e mecânicas dos scaffolds
Providenciar suporte estrutural às células	Providenciar suporte estrutural às células exógenas para estas se ligarem, crescerem, migrarem e se diferenciarem <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	Biomateriais com sítios para a ligação das células, estrutura porosa para a migração celular e difusão e nutrientes, resistência temporária para permitir a biodegradação após o implante
Contribuir para as propriedades mecânicas dos tecidos	Providenciar a estabilidade mecânica e forma ao defeito tecidual e dar a rigidez necessária aos tecidos intervenientes nos processos de engenharia tecidual	Biomateriais com propriedades mecânicas suficientes para preencher o espaço do defeito tecidual e simular as propriedades do tecido nativo
Providenciar a bioactividade necessária às células para responderem aos estímulos do seu microambiente	Interagir activamente com as células para facilitar a sua proliferação e diferenciação	Moléculas de adesão e outros factores que intervêm nas células
Actua como reservatório de factores de crescimento e potencia as suas acções	Reservatório de factores de crescimento exógenos	Microestruturas que retêm agentes bioactivos nos scaffold
Providencia um ambiente físico flexível que permite a remodelação em resposta a processos dinâmicos (reparação tecidual)	Providencia o espaço para a vascularização e a formação de tecidos <i>de novo</i> , bem como para a remodelação tecidual	Microestruturas porosas para a difusão de nutrientes e metabolitos, biocompatibilidade que relaciona o design da matriz do scaffold com a sua degradação controlada

Os scaffolds devem interagir com os componentes celulares que constituem os tecidos usados nos procedimentos de regeneração tecidual, para facilitar e regular as actividades desenvolvidas por eles. Os biomateriais incluem moléculas de adesão que intervêm na morfologia e alinhamento celulares, proteínas como os factores de

crescimento que aumentam a velocidade de regeneração (Chan, B., *et al.*, 2008) estimulando a proliferação e diferenciação das SC, para além de outros intervenientes no processo regenerativo, como: nutrientes que promovem a sobrevivência e o crescimento celulares e antibióticos que previnem o crescimento bacteriano (Figura 7.) (Rai, S., *et al.*, 2013).

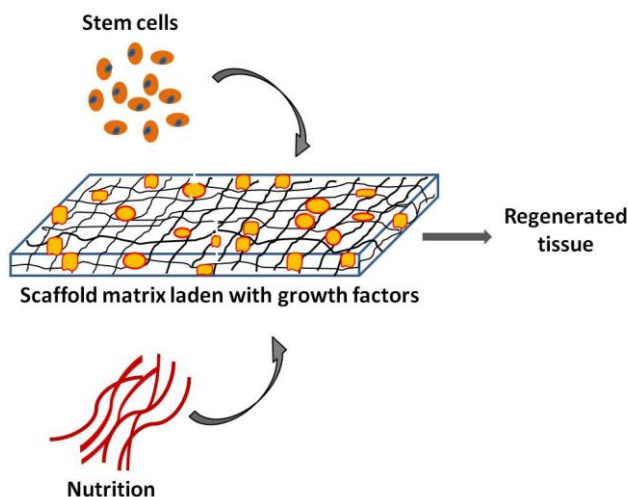


Figura 7. As SC são colocadas em scaffolds ricos em factores e nutrientes que permitem a regeneração, num meio semelhante ao natural (Sharma, S., *et al.*, 2014)

(<http://www.jcdr.net/ReadXMLFile.aspx?id=3937>).

Os scaffolds devem providenciar estabilidade mecânica e dar forma ao defeito tecidular onde são implantados, com as suas propriedades mecânicas intrínsecas a combinarem com as do tecido receptor. (Chan, B., *et al.*, 2008).

Em relação ao tamanho dos poros dos scaffolds que permitem o movimento das SC ao longo do scaffold para efectuarem as suas ligações, proliferarem e se distribuírem correctamente há ainda muitas incertezas. Ainda não foi determinado o tamanho ideal dos poros do scaffold para a regeneração dentária. Há que ter em conta os seguintes factores: se os poros forem pequenos apenas conseguem migrar algumas células e difundirem-se os nutrientes, sobrando uma superfície maior para a ligação celular, enquanto que, se os poros forem demasiado grandes as células podem difundir-se mais facilmente mas o scaffold degradar-se-á mais rapidamente do que o pretendido (Zhang, W., *et al.*, 2011).

Para se conseguirem desenvolver estratégias clínicas úteis na regeneração pulpar dentária, são necessários a caracterização e o desenvolvimento de scaffolds capazes de

manter a viabilidade das SC durante o transplante e de regenerar polpa funcional (Rosa, V., *et al.*, 2013).

Existem quatro tipos de scaffolds, sendo: scaffolds porosos pré-fabricados (2.3.1.), scaffolds constituídos por ECM de onde se retiraram as células originais (2.3.2.), ECM secretada por células isoladas em poços, sob a forma de lâmina ou folha para posterior enxerto (2.3.3.), e hidrogéis com células encapsuladas (2.3.4.) (Figura 8. e Tabela 4.) (Chan, B., *et al.*, 2008).

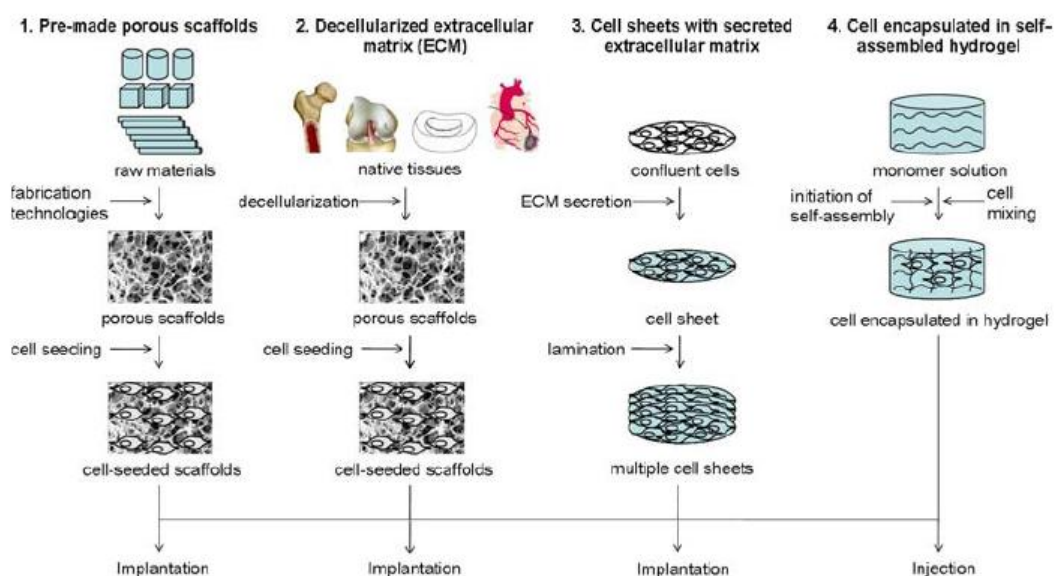


Figura 8. Características dos quatro diferentes tipos de scaffolds.

2.3.1. Scaffolds porosos pré-fabricados

Este tipo de scaffold pode manter a sua forma nativa, no caso de enxertos alogênicos e xenogênicos de ECM, ou podem ter a forma de pequenos blocos construídos, constituídos por cerâmicas como o fosfato de cálcio, ou polímeros inorgânicos como proteínas, polissacarídeos, lípidos e polinucleótidos.

Os scaffolds porosos naturais têm uma excelente biocompatibilidade, o que permite às células ligarem-se e crescerem em ótimas condições de viabilidade. E como desvantagem, apresentam uma estabilidade física e mecânica limitadas, o que os torna pouco aconselháveis para algumas aplicações.

Os scaffolds porosos sintéticos são constituídos por polímeros orgânicos ou sintéticos, o que permite um maior controlo sobre as suas propriedades físicas e mecânicas, permitindo a sua utilização em tecidos moles e mineralizados. Contudo, a

biocompatibilidade é o seu maior problema, uma vez que as células podem ter dificuldade em se ligar e crescer nestes materiais. Uma das possíveis formas de melhorar a sua biocompatibilidade é aplicar uma camada superficial de colagénio durante o processo de fabrico destes biomateriais (Chan, B., *et al.*, 2008).

2.3.2. Scaffolds de ECM sem células

São processados a partir de tecidos alogénicos ou xenogénicos e são os scaffolds que melhor simulam os tecidos nativos, podendo ser usados em vasos, nervos, tendões e ligamentos.

A descelularização é promovida por técnicas que combinam métodos físicos, químicos e enzimáticos, com a utilização de detergentes, EDTA, tripsina para remoção dos componentes celulares, entre outros. Para além da sua excelente biocompatibilidade, conservam alguns factores de crescimento que podem ajudar na proliferação e na sua remodelação celulares (Chan, B., *et al.*, 2008).

2.3.3. Scaffolds de ECM com células (lâmina)

Neste tipo de scaffold as células produzem a sua própria matriz após confluência celular e a mineralização ocorre sem métodos enzimáticos, por cultura celular com polímeros termo-sensíveis (Chan, B., *et al.*, 2008). Várias investigações utilizaram PLA (poli-L-ácido láctico) nestes scaffold rígidos que posteriormente são cortados em lâminas para serem implantados em animais (Rosa, V., *et al.*, 2013).

Algumas das desvantagens deste tipo de scaffold são as seguintes: dificuldade em construir lâminas com a espessura ideal, a revascularização acontecer demasiado rápido (Chan, B., *et al.*, 2008), e a adaptação do enxerto destes scaffold rígidos às paredes dentinárias ao longo dos canais radiculares ser difícil de conseguir (Rosa, V., *et al.*, 2013).

2.3.4. Hidrogéis com células encapsuladas

Os hidrogéis são injectados no local do defeito tecidular num processo de um único passo, simples e rápido, que permite a interação entre eles e as células endógenas

(Chan, B., *et al.*, 2008). Isto torna-se vantajoso no caso de se pretender regenerar tecido pulpar, sendo o hidrogel introduzido directamente no canal radicular (Codeiro, M., *et al.*, 2008).

Tabela 4. Características dos diferentes tipos de scaffolds.

	Scaffolds porosos pré-fabricados	Scaffolds de ECM sem células	Scaffolds de ECM com células	Hidrogéis com células encapsuladas
Materiais constituintes	Biomateriais naturais ou sintéticos	Tecidos alogénicos ou xenogénicos	Células	Biomateriais naturais ou sintéticos
Processo de fabrico	Materiais sólidos com poros incorporados	Técnicas de descelularização	Secreção de ECM por células após atingirem confluência	Processos controlados por pH e temperatura
Combinação celular	Cultura	Cultura	Células presentes antes da secreção da ECM	Células presentes
Transplante	Implante	Implante	Implante	Injecção
Vantagens	Escolha de materiais diversificada, arquitectura e microestrutura com design preciso	Melhor simulação da ECM nativa em termos de composição e propriedades mecânicas do scaffold	Secreção biocompatível da ECM	Injectável, num único passo simples e rápido, interação íntima entre as células e o material
Desvantagens	Tempo de cultura, distribuição não homogénea das células	Distribuição não homogénea das células, dificuldade em reter toda a ECM, imunogenicidade por descelularização incompleta	São necessárias múltiplas lâminas/folhas	Só para tecidos moles

Aplicações preferenciais	Tecidos moles e mineralizados	Tecidos com elevado conteúdo extracelular	Tecidos com elevada celularização, tecidos epiteliais, tecidos endoteliais, camadas tecidulares finas	Tecidos moles
---------------------------------	-------------------------------	---	---	---------------

Os biomateriais usados para fabricar os scaffolds têm que ser compatíveis tanto com as células manipuladas como com as células endógenas no tecido hospedeiro (Chan, B., *et al.*, 2008), e devem ser biodegradáveis (Yildirim, S., *et al.*, 2011) para que se possa ir degradando após a implantação a uma taxa correspondente à da produção da matriz do tecido em desenvolvimento (Chan, B., *et al.*, 2008).

O scaffold pode ser natural ou sintético (Tabela 5.), biodegradável ou permanente (Yuan, Z., *et al.*, 2011), o que torna a sua selecção um processo essencial à garantia da sua eficácia (Zhang, W., *et al.*, 2011).

Tabela 5. Materiais utilizados na construção de scaffolds.

Scaffolds Naturais	Scaffolds Sintéticos	Scaffolds Híbridos
Ácido Hialurónico	Ácido Poliglicólico	Hidrogel
Colagénio		
Fibrina	Ácido Polilático	
	Hidroxiapatite	
Quitosana	Policoprolactona	
Seda		

2.3.5. Scaffolds Naturais

Os scaffolds naturais podem ser feitos de colagénio, fibrina, ácido hialurónico (componentes da ECM) (Edalat, F., *et al.*, 2012), quitosana e seda (Tabela 5.) (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012).

Prescott *et al.*, introduziram DPSC que produzem a proteína da matriz dentinária num scaffold perfurado de colagénio simulando dentina e depois implantaram este conjunto (scaffold e células) subcutaneamente num rato imunocomprometido e verificaram, passadas seis semanas de incubação, que se podia observar tecido pulpar bem organizado.

Os scaffolds de colagénio são atractivos para a regeneração tecidual dentária uma vez que este é o maior componente da polpa humana e já está comprovado que este scaffold permite a sobrevivência e o crescimento das DPSC (Rosa, V., *et al.*, 2013). De facto, o colagénio tipo I já foi várias vezes utilizado como scaffold na engenharia tecidual, mas também a fibrina, o ácido hialurónico, o polietileno glicólico, sendo os estudos mais recentes realizados com scaffold de poliláctico glicólico (PLGA) e hidroxiapatite (HA) (Yuan, Z., *et al.*, 2011), sobre a forma de hidrogéis (Galler, K.M., *et al.*, 2011) para poderem ser injectados na área comprometida. Em contraste, utilizando DPSC de rato em scaffold do tipo sólido ou nanofibroso não se observou formação de esmalte, o que permite concluir que este tipo de scaffold não é eficaz para a diferenciação de células estaminais epiteliais (Zhang, W., *et al.*, 2011).

Em 2011, investigadores da Universidade de Massachusetts compararam dois tipos de scaffolds de seda, um deles com uma base aquosa e o outro com uma base de flúor, numa tentativa de comparar as suas propriedades, as suas características físicas e as suas capacidades de promoverem a ligação das SC bem como a diferenciação das SC. Utilizaram DPSC humanas nos respectivos scaffolds e implantaram-nas em modelos animais de rato com 4 semanas de idade, de onde foram consecutivamente colhidas pós-implante ao fim de 6, 18 e 25 semanas para caracterização. Os resultados obtidos permitem afirmar que o scaffold em flúor suporta melhor a regeneração da polpa e que o scaffold aquoso sofre degradação mais rapidamente (Zhang, W., *et al.*, 2011).

2.3.6. Scaffolds Sintéticos

Os scaffolds sintéticos são biopolímeros que permitem excelentes propriedades químicas e mecânicas, conseguindo-se um elevado controlo das suas características físico-químicas como: o peso molecular, a configuração das cadeias poliméricas e a presença de grupos funcionais. Os materiais mais utilizados para a construção dos scaffold sintéticos são: o ácido poliláctico (PLA), o ácido poliglicólico (PGA) e

copolímeros como o ácido polilático-coglicólico (PLGA) (Tabela 3.) (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012).

Young e a sua equipa implantaram células estaminais de suíno num scaffold de ácido polilático-coglicólico (PLGA, poly-L-lactide-co-glycolide) com sucesso apesar de as células implantadas não terem dado origem a estruturas com a forma pretendida (Hacking, S.A., *et al.*, 2009).

Em 2011, Jing Wang e os seus colegas compararam dois tipos de scaffolds, sólidos e nanofibrosos para verificar qual dos dois se ajustava melhor à diferenciação odontogénica das DPSC e mineralização do tecido regenerado. Os resultados *in vitro* mostram que, em comparação com os scaffolds sólidos, os scaffolds nanofibrosos aumentam tanto a ligação como a proliferação celular. Ambos os scaffolds estudados, o NF-PLA (nanofibroso) e o SW-PLA (sólido), eram constituídos por ácido polilático (PLA). Os resultados obtidos permitiram afirmar que os scaffolds nanofibrosos (NF) proporcionam um microambiente melhor para a proliferação das DPSC e da sua matriz extracelular, uma vez que a sua arquitetura nanofibrosa aumenta a adsorção protéica da fibronectina e da vitronectina, permitindo uma ligação de pré-ameloblastos mais eficaz. Além disso, os poros do scaffold nanofibroso permitem maior concentração de DPSC do que o scaffold sólido, permitindo uma melhor diferenciação odontogénica das DPSC humanas testadas e formação de novo tecido dentinário (Wang, J., *et al.*, 2011).

Uma formação dentinária semelhante à observada por Gronthos *et al.*, em que os tecidos formados continham uma estrutura dentinária típica, rodeada por células odontoblásticas com processos citoplasmáticos longos numa matriz mineralizada rodeada por vasos sanguíneos, foi também observada *in vivo* usando SHED recombinadas num meio de cultura com pó cerâmico de fosfato tricálcio e hidroxiapatite (Yan, M., *et al.*, 2011).

Estudos recentes para comparação de dois tipos de scaffold obtiveram os resultados a seguir apresentados. Um dos estudos verificou a regeneração de dentina após implante feito com DPSC em scaffold de hidroxiapatite com fosfato tricálcico (HA/TCP). Enquanto que outro estudo reportou a formação de esmalte, dentina e polpa bem organizada em construções com scaffold de poliglicólico e ácido láctico (PGA/PLA ou PLGA) após implante em modelos animais de rato e porco, com DPSC, SHED e SC epiteliais. Resultados semelhantes obtiveram-se utilizando as mesmas células MSC da polpa e do epitélio dentário colocadas em esponjas de colagénio que funcionaram como scaffold (Zhang, W., *et al.*, 2011).

Quando Gronthos *et al.* transplantaram subcutaneamente hDPSC (DPSC humanas) recombinantes com pó cerâmico de tricálcio e hidroxiapatite em ratos imunocomprometidos, os tecidos que se formaram continham uma estrutura dentinária típica, rodeada por odontoblastos com longos prolongamentos citoplasmáticos numa matriz mineralizada e à volta da matriz de dentina observaram-se vasos sanguíneos (Yan, M., *et al.*, 2011).

Trabalhos realizados em 2012 por uma equipa chinesa, usaram com sucesso SHED de porco, implantadas num modelo da mesma espécie animal, num scaffold de β -TCP (fosfato beta-tricálcio) onde ocorreu regeneração de dentina e que os defeitos do telhado da câmara pulpar foram quase totalmente restaurados. (Zheng, Y., *et al.*, 2012)

2.3.7. Scaffolds Híbridos

Outra escolha válida para suporte biomaterial na regeneração dentária são os polímeros híbridos (Yildirim, S., *et al.*, 2011) (Tabela 3.) com conteúdo hidrofílico e características mecânicas semelhantes ao tecido natural. Estes biopolímeros, denominados hidrogéis, têm sido recentemente explorados (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012). Os hidrogéis podem ser constituídos por biomateriais naturais ou sintéticos (Chan, B., *et al.*, 2008).

2.4. Factores

À cultura celular são acrescentadas moléculas de sinalização morfogénica essenciais à formação e reparação de polpa e dentina. Dessas moléculas fazem parte os factores de crescimento que permitem a sobrevivência das SC através da regulação da taxa de crescimento (Demarco, F., *et al.*, 2011), estimulando a proliferação, induzindo a diferenciação das SC noutros tipos celulares e estimulando-as a produzir matrizes mineralizadas (Rodríguez-Lozano, F.-J., *et al.*, 2012).

São exemplos de factores de crescimento utilizados na engenharia com SC: a proteína morfogénica do osso (BMP), o factor de crescimento fibroblástico (FGF), o factor de crescimento transformante-beta (TGF- β) e o factor de crescimento endotelial vascular (VEGF) (Rai, S., *et al.*, 2013).

As proteínas morfogénicas do osso (BMP) são factores de crescimento que participam na morfogénese de vários órgãos e tecidos incluindo os dentes, tendo sido originalmente

identificadas como reguladoras da formação da cartilagem e do osso por Urist em 1965, fazem parte da família dos factores de crescimento transformante-beta (TGF- β) (Demarco, F., *et al.*, 2011).

2.5. Transplante das SC dentárias /Implante *in vivo*

Depois da expansão e diferenciação celulares das SC em scaffold enriquecidos com factores de crescimento, nutrientes e outros (descrito anteriormente), as células estaminais da polpa são implantadas *in vivo* em modelos animais (Figura 9. B.) (Kodonas, K., *et al.*, 2012).



Figura 9. B. Imagem radiográfica de um implante de SC dentárias (seta) no porco *in vivo* (Kodonas, K., *et al.*, 2012).

Hoje em dia, as técnicas de transplante das SC têm melhorado com a utilização de scaffold hidrogel que permitem a injeção das células directamente no defeito dentário que se pretende restituir (Feng, R., *et al.*, 2013).

O sucesso do transplante das SC requer um número suficiente de células que mantenham a viabilidade e a capacidade odontogénica necessárias à produção de ECM para regeneração tecidual. Esta viabilidade está associada à estabilidade genética das SC que pode ser avaliada (Egusa, H., *et al.*, 2012).

Os potenciais problemas associados ao implante das amostras em cultura são os procedimentos especializados necessários para a adesão celular às paredes dos canais radiculares, tornando essencial a adição de moléculas que estimulam a adesão ao scaffold, para além do facto da taxa de sobrevivência das células que pode ser reduzida (Rai, S., *et al.*, 2013).

3. Investigações recentes com DPSC

3.1. Por Gronthos, S., *et al.*, em 2000

Gronthos *et al.* foram os primeiros a isolar populações progenitoras odontogénicas de tecido pulpar adulto, verificando que as células pulpares, derivadas de tecidos pulpares e radiculares em estadios precoces do desenvolvimento dentário, e cultivadas sob certas condições, conseguem produzir células com aparência de odontoblastos que demonstraram capacidade para formar nódulos mineralizados *in vitro*. As DPSC são ASC com capacidade de formar clones, possuem elevada taxa de proliferação e são capazes de regenerar um tecido (Gronthos S., *et al.*, 2000).

Seguidamente serão descritas as principais observações elaboradas por Gronthos *et al.* durante a sua investigação com DPSC.

Gronthos iniciou a caracterização das células estaminais da polpa através da analogia com as BMSC, sabendo que o osso humano se formava após transplante de BMSC em scaffold de hidroxiapatite e fosfato de tricálcio (HA/TCP). A partir desta informação extrapolou a possibilidade das DPSC expandidas *in vitro* serem capazes de regenerar uma estrutura pulpo-dentinária *in vivo* sob condições semelhantes às estudadas anteriormente para as BMSC.

Para isolar DPSC Gronthos utilizou métodos previamente desenvolvidos para o mesmo propósito nas BMSC. Comprovou que há uma população de células com potencial de clonagem na polpa humana adulta através do processo de contagem de CFU (colónia celular) formados por suspensão de BMSC e verificou que a formação de colónias pelas DPSC apresentam uma frequência aparentemente mais elevada do que a demonstrada pelas BMSC. Contudo, isto podia ser devido à constituição básica destes dois tipos de tecidos conjuntivos, uma vez que a polpa é um tecido fibroso enquanto que 99% da medula óssea são células hematopoiéticas. De facto, quando a amostra de BMSC é sujeita a digestão enzimática com collagenase para se tornar livre de células hematopoiéticas, a incidência de CFU aumenta drasticamente, assemelhando-se mais à quantidade de CFU conseguidas por cultura de DPSC.

Gronthos verificou que as DPSC exibem uma taxa de proliferação mais elevada do que as BMSC *in vitro*. As DPSC mantêm a taxa de proliferação elevada mesmo depois de extensamente cultivadas, satisfazendo deste modo e juntamente com a sua natureza clonogénica, dois dos critérios de classificação das ASC.

Apesar da sua localização tão distinta, as DPSC e as BMSC partilham algumas características. Potentes reguladores da formação óssea com o factor de crescimento transformante- β e as proteínas morfogénicas do osso (BMP-2 e BMP-4) foram identificados como reguladores da diferenciação odontoblástica. Há outros factores de crescimento que regulam a proliferação e diferenciação dos precursores odontoblásticos como o factor de crescimento fibroblástico, o factor de crescimento epidérmico, o factor necrosante tumoral- α e IL- β 1.

Os osteoblastos e os odontoblastos expressam proteínas da matriz mineralizada semelhantes como a proteína da matriz dentinária 1, fibronectina, colagénio tipo I, fosfatase alcalina, osteonectina, osteopontina, sialoproteína do osso e osteocalcina. Duas excepções notáveis são a sialoproteína e a fosfoproteína da dentina apenas expressas pelas DPSC, e codificada por um gene comum, o DSPP. A expressão da sialoproteína e da fosfoproteína da dentina está associada à dentinogénese, ocorrendo depois da formação da matriz de pré-dentina.

A natureza heterogénea das DPSC pode dever-se aos vários estádios de desenvolvimento ou pode representar diferentes linhagens celulares pulpares. O transplante de hDPSC para um rato imunocomprometido providencia um novo modelo para caracterização destas SC. A quantidade de dentina e tecido pulpar formados a partir de um transplante excede bastante a quantidade gerada destes tecidos *in situ* durante a sua vida. Por isso pode usar-se uma grande quantidade de DPSC isoladas de um só dente para tratar vários dentes.

Apesar das DPSC e as BMSC serem reguladas por factores semelhantes e expressarem um perfil protéico comum, estas populações celulares diferem significativamente nas suas capacidades proliferativa e de diferenciação *in vitro*, e, mais importante, são distintas na sua capacidade de desenvolverem tecidos de novo *in vivo*, devido ao microambiente de que derivam. Apenas algumas colónias de BMSC têm potencial de diferenciação em múltiplas linhagens *in vitro* e a capacidade para formar tecido ósseo *de novo* ou novos elementos celulares da medula *in vivo*.

O transplante de DPSC é caracterizado por possuir uma camada de odontoblastos alinhados numa camada bem definida que expressam a DSPP (proteína específica da dentina) com os seus prolongamentos orientados na mesma direcção dos túbulos dentinários da nova dentina gerada (dentina regenerada). Verifica-se a presença de uma matriz colagénica semelhante à encontrada na dentina primária com fibras ordenadas perpendicularmente em relação à camada de odontoblastos, ao contrário da matriz não-

tubular (mais desorganizada) típica da dentina secundária ou reparadora. Os componentes da ECM do transplante das DPSC é evocativo dum tecido pulpar fibroso: infiltrado por vasos sanguíneos, distinto do transplante de BMSC com medula formada com elementos hematopoiéticos e adipócitos.

A frequência de colónias formadas por DPSC foi significativamente mais elevada do que a frequência de colónias formadas por BMSC.

Depois do trabalho realizado por Gronthos e a sua equipa, surgiram novas investigações sobre as DPSC nos últimos anos. Serão descritas em seguida aquelas que seguem o seu legado com novos resultados.

3.2. Por Iohara, K., *et al.*, em 2004

Em 2004 Iohara *et al.*, cultivaram DPSC de porco num meio com BMP-2 e posteriormente transplantadas para incisivos superiores de cão previamente extraídos. Quatro semanas depois do transplante, os modelos de cão preenchidos com SC de polpa de porco foram analisadas por PCR, exame histológico e análise estatística, e os investigadores verificaram que as DPSC induzidas por BMP-2 diferenciam-se em odontoblastos capazes de formar dentina (Iohara, K., *et al.*, 2004).

3.3. Por Huang, G., *et al.*, em 2009

Huang, G., *et al.*, em 2009, utilizou um modelo animal de rato para implantar subcutaneamente hDPSC e hBMSC misturadas num scaffold de um copolímero de poli-D,L-lático (PLA) e poliglicólido (PGA) (Figura 10.).

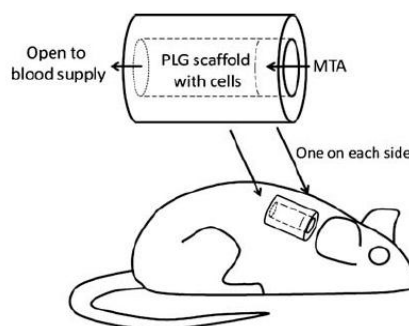


Figura 10. Um rato imunocomprometido serviu de modelo subcutâneo para regeneração de polpa e dentina a partir de hDPSC (Huang, G., *et al.*, 2009).

As DPSC foram recolhidas de 12 dentes do siso com e sem apéx aberto, de oito dadores com idades entre os 16 e os 24 anos, e as BMSC foram isolados do fémur de doentes saudáveis com idades compreendidas entre os 20 e os 63 anos. As DPSC foram isoladas e seguidamente colocadas numa solução de collagenase tipo I (3mg/ml) e dispase (4mg/ml) para sofrerem digestão enzimática durante 30 a 60 minutos e a uma temperatura de 37°C.

Obtiveram-se suspensões celulares que foram colocadas em seis placas com meio *α-essencial* e outros componentes, como: soro de bovino fetal (15-20%), glutamina (2mM), fosfato de ácido ascórbico (100μm), penicilina (100U/ml), streptomycina (100μg/ml) e fungizona (0,25 μg/ml), mantidos em condições de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Houve formação de colónias de fibroblastos 1 a 2 semanas depois e até se atingir uma confluência celular de 80%. As populações heterogéneas de DPSC foram congeladas em nitrogénio líquido, e expandidas à terceira passagem. As BMSC foram isoladas da mesma forma que as DPSC e cultivadas no meio modificado de Eagle.

Na preparação dos fragmentos radiculares dos dentes humanos, utilizados como modelos hospedeiros das células estaminais, os canais com aproximadamente 7mm de comprimento foram alargados entre 1 a 2,5mm no seu diâmetro durante a pulpectomia. Posteriormente utilizou-se cimento de MTA (mineral trióxido agregado) para obturação de um dos canais, enquanto o outro ficou vazio, e as células estaminais foram inseridas tanto no espaço radicular vazio como no canal que continha MTA.

Os fragmentos foram depois implantados subcutaneamente num rato fêmea imunocomprometido de 6 a 8 semanas de idade, dois fragmentos um de cada um dos lados do rato, as feridas posteriormente suturadas. Foram também implantados fragmentos radiculares vazios noutros ratos usados como controlo. Ao fim de 3 a 4 meses os ratos foram mortos por eutanásia para remoção dos fragmentos e respectiva análise histológica.

Verificou-se regeneração de tecido pulpar e de tecido dentinário humanos, apesar dos odontoblastos da dentina regenerada não apresentarem a conformação morfológica natural. As células expressaram os marcadores CD73, CD90 e CD105 de forma moderada a elevada, tendo estes sido identificados por citometria de fluxo activada por fluorescência (FACS), enquanto que mais de 95% das mesmas células se mostrou negativa para os marcadores o CD14, CD34 e o CD45. Ou seja, foram positivas para

marcadores celulares mesenquimais e negativas para marcadores celulares hematológicos.

Verificou-se que as DPSC produzem maior quantidade de matriz extracelular e mineralização do que as BMSC (Figura 11.).

O canal que tinha o MTA manteve-se vazio e o canal preenchido com células estaminais regenerou tecido pulpar totalmente vascularizado com células de densidade uniforme como acontece na polpa natural. No grupo de controlo, o espaço canalar vazio foi preenchido por tecido adiposo que preencheu cerca de 2 mm do canal (Figura 12. A-.B.).

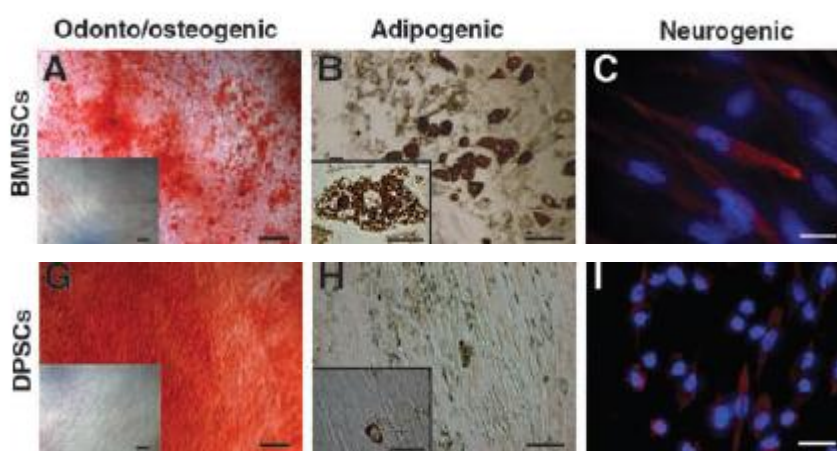


Figura 11. Comparação da indução odontogénica, adipogénica e neurogénica entre as DPSC e as BMSC. Maior coloração positiva para a matriz mineralizada das DPSC (G) comparativamente com as BMSC (A). Maior diferenciação adipogénica das BMSC (B) em comparação com as DPSC (H). Maior diferenciação neurogénica das DPSC (I) em comparação com as BMSC (C).

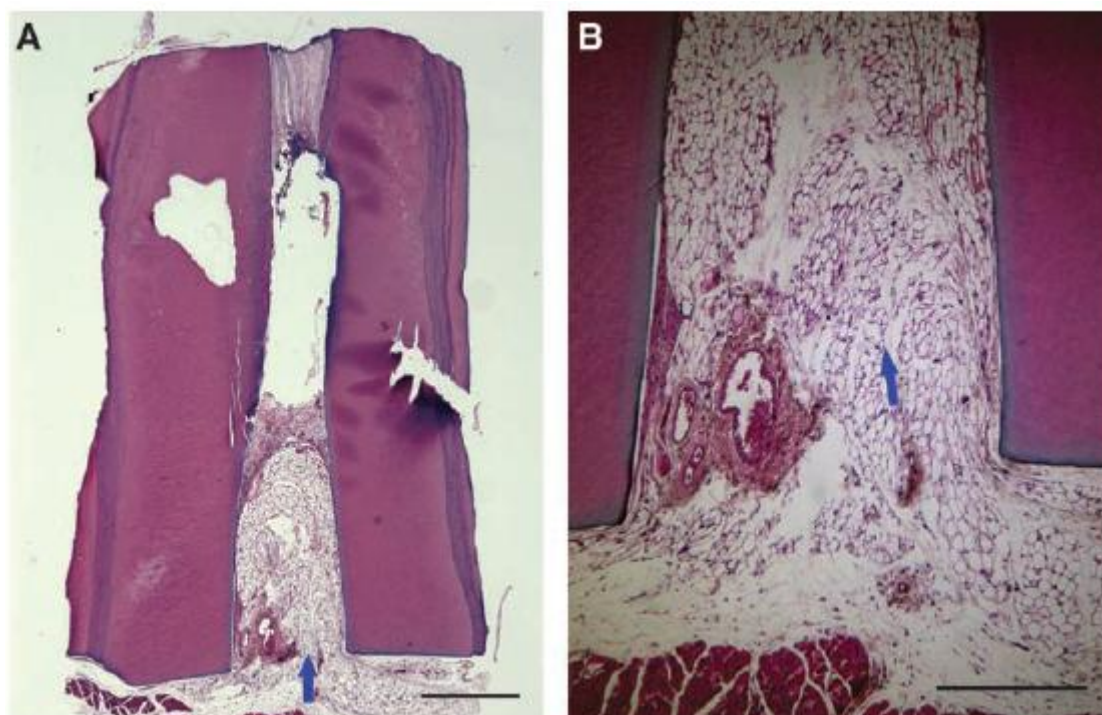


Figura 12. A.-B. Análise histológica do grupo de controlo Um fragmento de raiz humana com canal radicular vazio foi transplantado subcutaneamente para um rato imunocomprometido do grupo de controlo. A seta indica o tecido subcutâneo do rato a desenvolver-se e a introduzir-se no canal radicular humano através da sua abertura/ápex (A), maior ampliação (B).

As DPSC colocadas no canal formaram uma camada de tecido mineralizado uniforme com uma espessura de aproximadamente 200µm depositada ao longo das paredes de dentina pré-existentes e ao longo da superfície de MTA dentro do canal, bem como uma camada de odontoblastos que se alinhou ao longo da camada de dentina mineralizada (Figura 13.).

A nova dentina depositada ficou aderente à dentina pré-existente, mas a polpa do lado da dentina regenerada não era macia, pelo contrário, existiam projecções de estruturas dentro da polpa e os odontoblastos não se apresentavam bem organizados, tendo sido difícil observar as características típicas dos odontoblastos naturais (por exemplo, o seu corpo celular polarizado, isso não foi observado). Utilizaram-se anticorpos de mitocôndria humana e a maioria das células apresentou coloração positiva, conformando a origem humana das células da polpa regenerada.

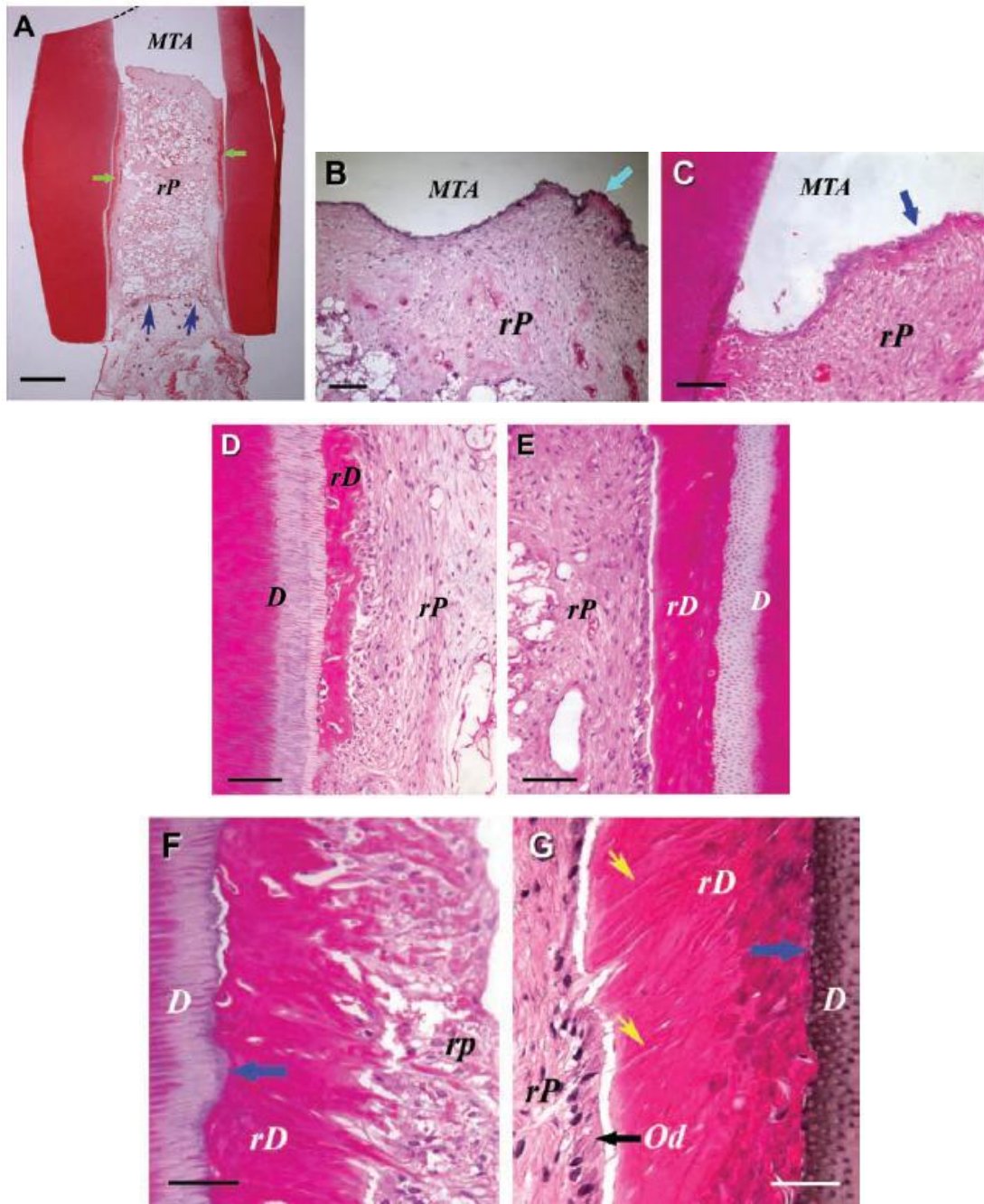


Figura 13. Análise histológica da regeneração de dentina e polpa *in vivo* usando DPSC. D - dentina pré-existente, rD - dentina regenerada, rP - polpa regenerada, Od - odontoblastos. As setas verdes indicam a dentina regenerada e as setas azuis indicam a entrada do fornecimento sanguíneo (A), as setas azuis indicam uma fina camada de dentina regenerada por baixo do canal preenchido com cimento de MTA (B e C), interface da dentina com a dentina regenerada e polpa regenerada (D e E), as setas azuis indicam a junção da dentina pré-existente com a dentina regenerada (F e G), as setas pretas indicam os odontoblastos que se podem observar alinhados e as setas amarelas indicam os túbulos dentinários (G). *Scale bars:* 1mm (A), 200µm (B), 100µm (C-E), e 50µm (F e G).

Este trabalho permitiu concluir que as hDPSC produzem mais matriz mineralizada do que as BMSC e que as hDPSC permitem formar dentina de novo apesar dos odontoblastos diferenciados não apresentarem uma morfologia típica.

3.4. Por Alge, D., *et al.*, em 2010

Alge, D., *et al.*, realizaram um trabalho experimental para comparar as características das DPSC e as das BMSC de um mesmo dador. Recolheram os dois tipos celulares de um único rato adulto, para poderem comparar diferentes tipos celulares oriundos de um mesmo dador, e implantaram as células num modelo animal também de rato. Foram extraídos os incisivos mandibulares de um rato e posteriormente isoladas as células da polpa, a mandíbula foi removida e os tecidos moles que rodeavam os dentes foram dissecados para se conseguir observar a inserção dos dentes.

Os dentes foram colocados numa imersão de povidona a 1% durante 2 minutos e depois numa imersão de tiosulfato de sódio 0,1% durante 1 minuto. A polpa foi removida de cada dente e cultivada numa mistura enzimática que continha collagenase tipo I, collagenase tipo II e termolisina. Passados 40 minutos de incubação a 37°C as enzimas foram neutralizadas num meio de cultura com soro 10% e a polpa foi recolhida por centrifugação. As BMSC foram recolhidas com uma seringa, da tíbia e do fémur do rato. Em 6 placas para cada tipo de células, BMSC e as DPSC, cultivaram-se 10.000 células a 37°C em 5% de CO₂, no meio de cultura de Eagle α -modificado, contendo FBS, penicilina, glutamina e streptomomicina e tendo sido trocado duas vezes por semana até se atingir uma confluência celular de 70%. Por fim, as células foram tripsinizadas e incubadas com os seguintes anticorpos de rato: CD11b, CD29, CD59, CD90 e CD106.

Após 5 dias em cultura, tanto as DPSC como as BMSC tinha proliferado e formado colónias (Figura 14.), exibindo uma morfologia fibroblástica e mostrando-se positivas para algumas moléculas de adesão tais como: CD29, CD59, CD90 e CD106, e negativas para os marcadores hematológicos CD45 e CD11b. Ou seja, foram positivas para marcadores celulares mesenquimais e negativas para marcadores celulares hematológicos.

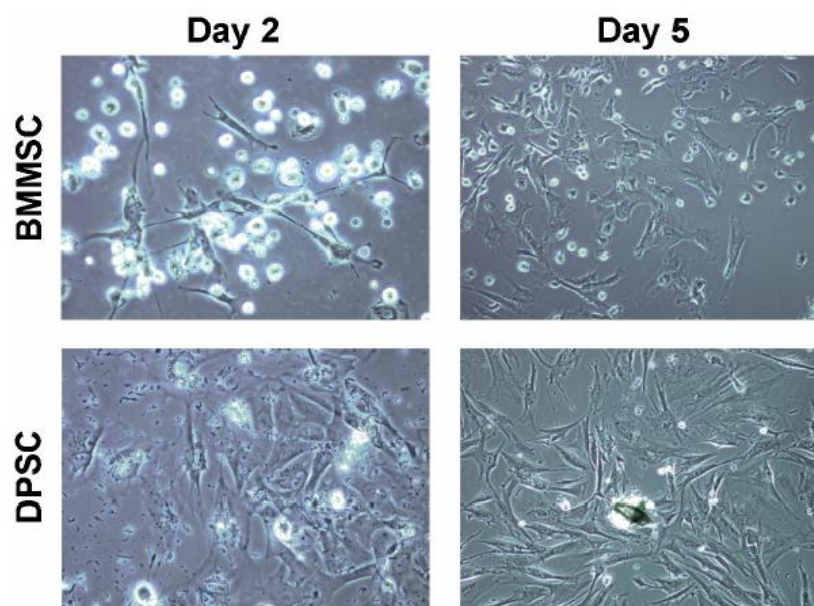


Figura 14. Proliferação de novas culturas de DPSC e BMSC. Fotografias representativas (amplificação de 40x) de culturas de DPSC e BMSC após 2 e 5 dias de cultura mostram que ambas as células parecem saudáveis, em proliferação e exibem uma morfologia fibroblástica típica de MSC.

Depois de 3 semanas formaram nódulos mineralizados num meio de cultura osteogénico (Figura 15. A. e B.); o que é importante dado o interesse de se usarem estas células para a regeneração de tecidos mineralizados.

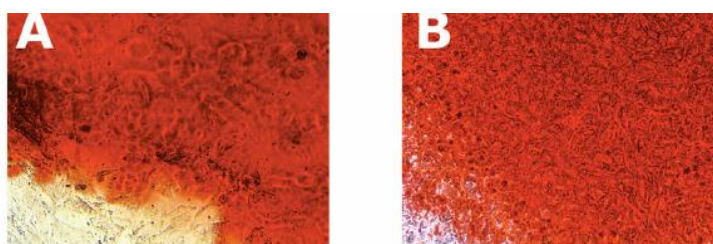


Figura 15. A. e B. Coloração positiva com alizarina das DPSC e das BMSC. Tanto as DPSC (A) como as BMSC (B) formaram nódulos mineralizados (amplificação de 20x).

A taxa de proliferação foi avaliada com base no tempo de duplicação, calculado para as DPSC ($39,6 \pm 2,5$ horas) e significativamente mais rápido do que o calculado para as BMSC ($61,7 \pm 4,1$ horas) (Figura 16.).

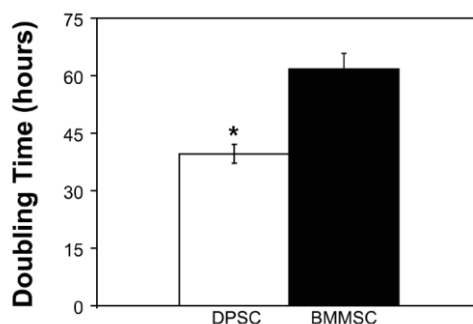


Figura 16. As DPSC têm um tempo de duplicação significativamente mais curto do que as BMSC. As DPSC e as BMSC foram colocadas em placas 10.000 e 20.000 células por placa, cada uma em 6 placas diferentes, e colocadas em cultura durante 96 horas. As DPSC mostraram possuir um tempo de duplicação de $39,6 \pm 2,5$ horas, significativamente mais curto do que o de $61,7 \pm 4,1$ horas, demonstrado pelas BMSC ($n=4$; $P=0,0192$).

O número total de células obtidas após a digestão celular (aproximadamente $0,5-1 \times 10^6$ células/dente) foi significativamente menor relativamente às BMSC (aproximadamente 100×10^6 células mononucleares/osso) (Figura 17.), embora a polpa possuísse um número mais elevado de células estaminais mesenquimais. Os clones celulares de DPSC retinham a capacidade de proliferar depois de formarem colónias, enquanto que as BMSC de forma geral não conseguiam; isto sugere que as DPSC contêm mais células estaminais com o potencial proliferativo necessário para as aplicações em engenharia tecidual do que as BMSC.

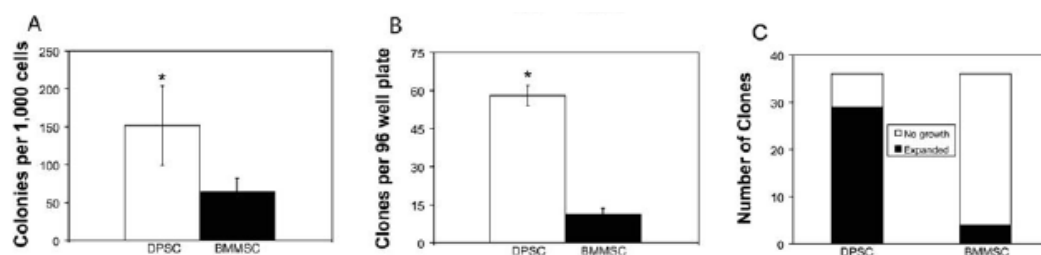


Figura 17. As DPSC geraram significativamente mais colónias e contêm significativamente maior potencial clonal do que as BMSC. As DPSC e as BMSC foram colocadas em placas de 2,000 e 5,000 células/poço em 15 poços, e ao fim de 14 a 21 dias em cultura, as colónias com mais de 1 mm de diâmetro por poço foram contabilizadas. As DPSC formaram significativamente mais colónias, $151,5 \pm 52,3$ colónias/1,000 células, quando comparadas com as $63,8 \pm 18,1$ colónias/1,000 células para as BMSC ($n=4$; $P=0,023$) (A). As DPSC e as BMSC foram recolocadas numa placa de 96 poços, cada um com uma célula. Ao fim de 21 dias as DPSC tinham formado $58,1 \pm 4$ clones/placa, o que foi significativamente maior do

que os $11,1 \pm 2,6$ clones/placa formados pelas BMSC ($P < 0,0001$) (B). 36 clones de cada tipo celular foram cultivadas em placas de 24 poços e o potencial de expansão foi avaliado. Enquanto que algumas BMSC retiveram a sua capacidade proliferativa depois de recultivadas (4/36), uma fracção significativamente maior de clones de DPSC (29/36) proliferaram ($n=8$ placas de duas experiências independentes; $P < 0,0001$) (C).

Neste trabalho demonstrou-se a formação mineral e quantificou-se o potencial de mineralização das DPSC através do cálculo da actividade da fosfatase alcalina (Figura 18.C.), verificando-se que a actividade da fosfatase alcalina era significativamente mais elevada para as DPSC do que para as BMSC. Em contraste com o dente humano, os incisivos dos ratos crescem continuamente, o que deve resultar em diferenças significativas entre as rDPSC e as hDPSC.

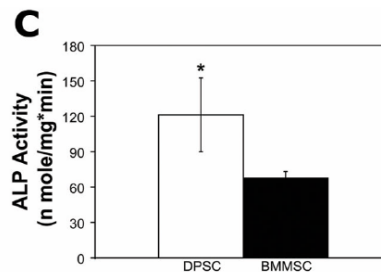


Figura 18.C. Actividade da fosfatase alcalina das DPSC e das BMSC. As DPSC tiveram uma actividade de fosfatase alcalina de $121,3 \pm 31,3$ nmole/mg*min significativamente maior, comparativamente com as BMSC que tiveram de $67,7 \pm 5,4$ nmole/mg*min ($n=3$; $P=0,0102$).

3.5. Por Balic, A., *et al.*, em 2010

Balic *et al.*, compararam DPSC, BMSC e osteoblastos oriundos de molares não erupcionados e erupcionados de ratos. Os dadores da primeira amostra, dentes não erupcionados, tinham entre 5 e 7 semanas de idade, enquanto que os dadores da segunda amostra tinham entre 18 e 21 semanas de idade.

Apesar das semelhanças existente entre as DPSC e as BMSC, o seu potencial dentinogénico é muito diferente (Figura 19.). Comparado com a mineralização das DPSC, as BMSC apresentam uma distribuição irregular nos nódulos mineralizados (Figura 20.), e a quantidade de mineralização aumentou com o tempo de cultura (Balic, A., *et al.*, 2010).

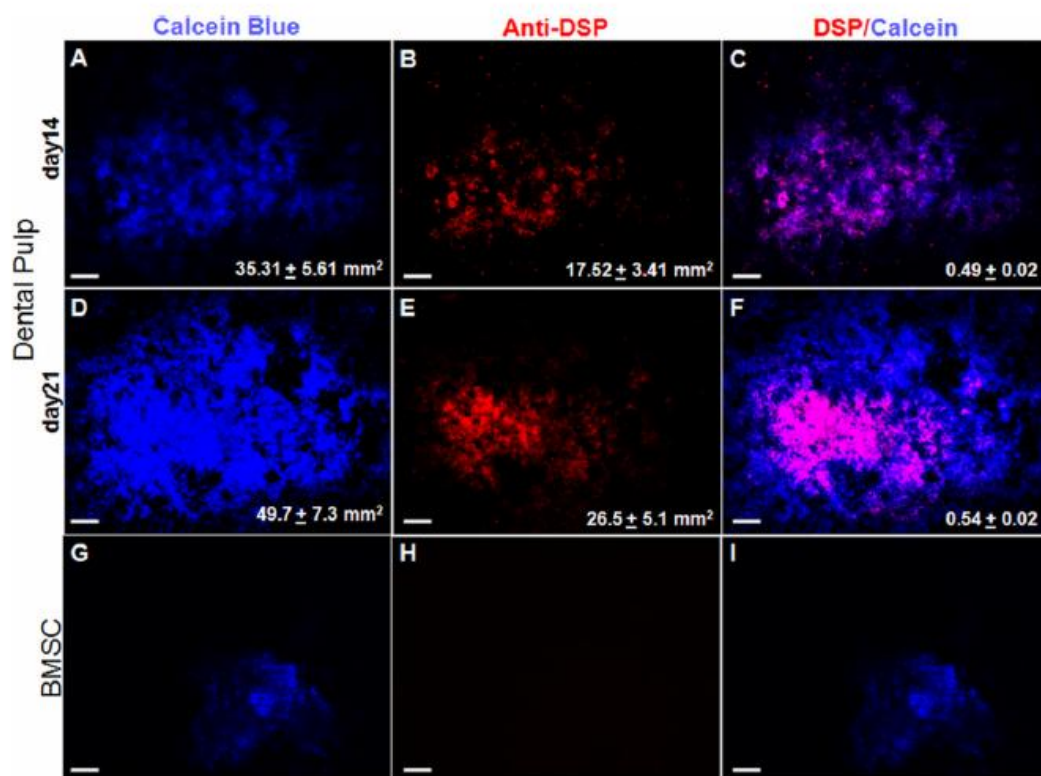


Figura 19. Expressão odontogénica das DPSC e das BMSC. As rDPSC oriundas de molares erupcionados formaram mais nódulos mineralizados ao vigésimo primeiro dia (D) do que ao décimo quarto (A) e do que as rBMSC (G). As rDPSC mostraram uma expressão de DSP significativamente mais elevada ao vigésimo primeiro dia de cultura (E e F) do que ao décimo quarto (B e C). Esta expressão foi significativamente maior em comparação com as rBMSC (I).

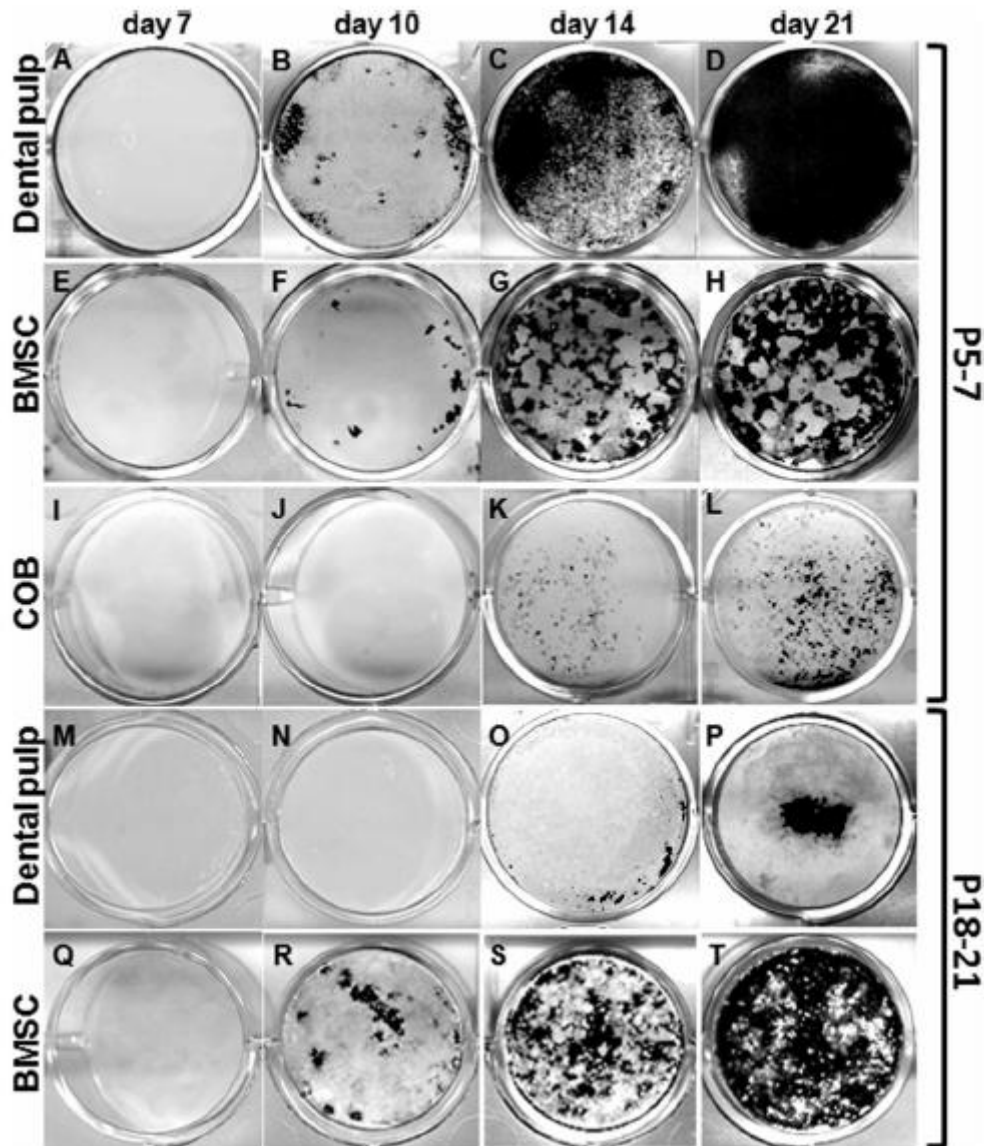


Figura 20. Comparação da mineralização *in vitro* das rDPSC (ratos com 5 a 7 semanas de idade, P5-7; e ratos com 18 a 21 semanas de idade, P18-21), das rBMSC e dos osteoblastos nos dias 7, 10, 14 e 21 de cultura. Os primeiros sinais de mineralização para as DPSC e BMSC só surgem ao décimo dia de cultivo, e para os osteoblastos apenas apareceram ao décimo quarto dia de cultivo. As rBMSC demonstram uma mineralização mais irregular em comparação com as rDPSC. As rDPSC dos dentes não erupcionados (P5-7) apresentam uma quantidade de nódulos mineralizados mais elevada do que as rDPSC dos dentes erupcionados (P18-21).

Este trabalho permite concluir que as BMSC podem não ser um óptimo substituto das DPSC na regeneração tecidual dentária (Balic, A., *et al.*, 2010).

3.6. Por Kawashima, N., em 2012

Num outro trabalho experimental, com o transplante de DPSC com marcadores CD31 e CD146 para um modelo *in vivo* após apexificação, observou-se a regeneração completa de todo o tecido pulpar com vasos sanguíneos e nervos após 14 dias (Kawashima, N., 2012). Experiências com ratos saudáveis demonstraram que o tecido pulpar tem capacidade para reparar tecidos conjuntivos, o que sugere que a regeneração do complexo pulpo-dentinário pode ser induzido por tecido pulpar remanescente saudável sob condições específicas como a presença de um suplemento sanguíneo abundante (Kawashima, N., 2012).

As MSC dentárias podem realizar dentinogênese sem interações epitélio-mesênquima e formar o complexo pulpo-dentinário contendo odontoblastos, pré-dentina, dentina e túbulos dentinários (Yan, M., *et al.*, 2011). Muitos estudos revelam a capacidade das DPSC para formar tecidos duros como a dentina ou o osso, enquanto que os estudos sobre a regeneração de toda a polpa em tecido conjuntivo incluindo vasos sanguíneos e nervos são mais escassos (Kawashima, N., 2012).

3.7. Por Atari, M., *et al.*, em 2012

Em 2012, Atari e a sua equipa realizaram estudos sobre regeneração dentária com células estaminais da polpa de humanos tendo recolhido hDPSC de dentes do siso de 20 indivíduos, de ambos os sexos, com idades entre 14 e 60 anos, extraídos por motivos ortodônticos ou profiláticos, e posteriormente implantaram-nas num modelo animal de dentes de rato. Após a injeção das hDPSC no modelo animal houve formação de colónias celulares e de teratoma (Figura 21. F.), HE-positivas para tecidos da mesoderme, endoderme e ectoderme, comprovando a pluripotência que se pensava ser exclusiva das ESC.



Figura 21. F. Transplantes das hDPSC para um rato imunocomprometido e formação de um teratoma ao fim de 5 semanas.

As hDPSC foram cultivadas até se atingir uma densidade de 80 a 100 células/cm² e foi realizada expansão celular através de várias passagens até as culturas atingirem uma confluência de 60%.

No exame morfológico das hDPSC por microscopia electrónica de transmissão verificou-se que as hDPSC possuem núcleo grande relativamente ao seu volume citoplasmático (Figura 22. D.).

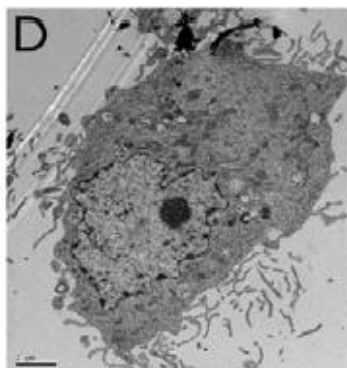


Figura 22. D. Análise morfológica das hDPSC examinadas por microscopia electrónica de transmissão. As hDPSC apresentam núcleo grande e um volume citoplasmático pequeno. Escala bar: 10µm.

Demonstrou-se com este trabalho que as hDPSC têm propriedades pluripotentes que não foram encontradas em nenhuma outra células estaminais de nenhum outro tecido adulto (Figura 23.). No estudo por RT-PCR as DPSC expressam marcadores embrionários como o OCT3/4, o NANOG (mantêm a capacidade de diferenciação multilinhagem e auto-renovação) e o SSEA4, indispensáveis para a divisão das células estaminais.

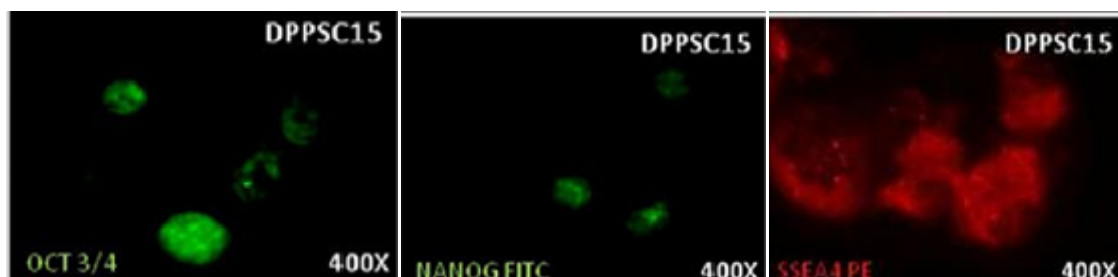


Figura 23. Análise do fenótipo das hDPSC por microscopia confocal. Expressão positiva de SSEA4, OCT3/4 e NANOG.

3.8. Por Wang, Y., *et al.*, em 2013

Em 2013, Wang, Y., *et al.*, realizaram um trabalho de regeneração pulpar com células estaminais da polpa de humanos e de cães. Para isso recolheram DPSC de dois dentes do siso de um indivíduo masculino com 18 anos e forâmen apical aberto e células estaminais da polpa de três molares de cães da raça Beagle consanguíneos com aproximadamente 19 semanas de idade e com peso aproximado de 13,5 kg, no estadio 8 de *Nolla* (2/3 de desenvolvimento radicular) e implantaram estas células num modelo animal canino (os mesmos cães usados como dadores celulares).

O modelo animal utilizado foram 12 dentes incisivos superiores, 4 dentes de cada um dos Beagle utilizados como dadores. A exodontia dos 2 sisos impactados com forâmen apical aberto para recolha das células estaminais adultas da polpa humana foi realizada com anestesia geral. Seguiu-se o protocolo de extracção dentária aprovado pelo Comité de Ética da Escola de Medicina da Universidade de Peking após obtenção do consentimento informado. Também a recolha das células estaminais da polpa adulta de canídeos de 3 dentes foi feita sob anestesia geral, e o modelo animal canino usado correspondeu a incisivos definitivos sem polpa de 3 cães de raça Beagle. Utilizaram-se 4 incisivos superiores de cada um dos cães, totalizando 12 dentes incisivos definitivos. Os cães estavam em quartos com luz e temperatura controlados, seguiram-se as Guidelines do Instituto Nacional de Saúde dos Estados Unidos que prezam os cuidados do uso de animais para procedimentos experimentais, e recomendações das Regras Administrativas de Beijing dos Animais de Laboratórios.

Os modelos animais foram utilizados para posteriormente se realizar o implante das células estaminias da polpa humana bem como o implante das células estaminais da polpa canina. Aos incisivos superiores extraídos foi realizada remoção pulpar, e os canais radiculares foram lavados com hipoclorito de sódio 5,25% e cloreto de sódio 0,9%. A superfície dos dentes foi limpa, e depois foi feito um corte na junção amelo-cimentária para exposição da câmara pulpar. O tecido pulpar foi separado da coroa e da raiz, e foi posteriormente colocado numa solução de collagenase tipo 1 (3mg/ml) e dispase (4mg/ml) durante 1 hora à temperatura de 37°C.

Obtiveram-se suspensões celulares das duas amostras de SC que foram colocados em meio de cultura celular de Eagle α -modificado com 15% de soro de bovino fetal, penicilina (100U/ml) e streptomomicina (100mg/ml), incubadas a 37°C a 5% de CO₂. As culturas celulares foram fixadas com formol 4% e coradas com azul de toluidina 0,1%,

tendo-se obtido colónias com agregados celulares superiores a 50 células. Para a expansão *in vitro* as hDPSC e cDPSC foram colocadas separadamente em placas de 96 poços, adicionando-se 10 microlitros de tetrazolium e sal de monosódio a cada placa antes de serem incubadas a uma temperatura de 37°C durante 4 horas e avaliou-se o número de células viáveis de acordo com as instruções do fabricante nos primeiro, terceiro e quinto dias de incubação.

Os valores de densidade óptica foram analisados estatisticamente e as curvas de crescimento para as células estaminais da polpa humana e canina foram obtidas utilizando o software SPSS. Obtiveram-se 150 colónias/10⁴ células da polpa canina e 60 colónias/10⁴ células da polpa humana, o que permite afirmar que a formação de colónias celulares caninas foi significativamente mais elevada (Figura 24. C.).

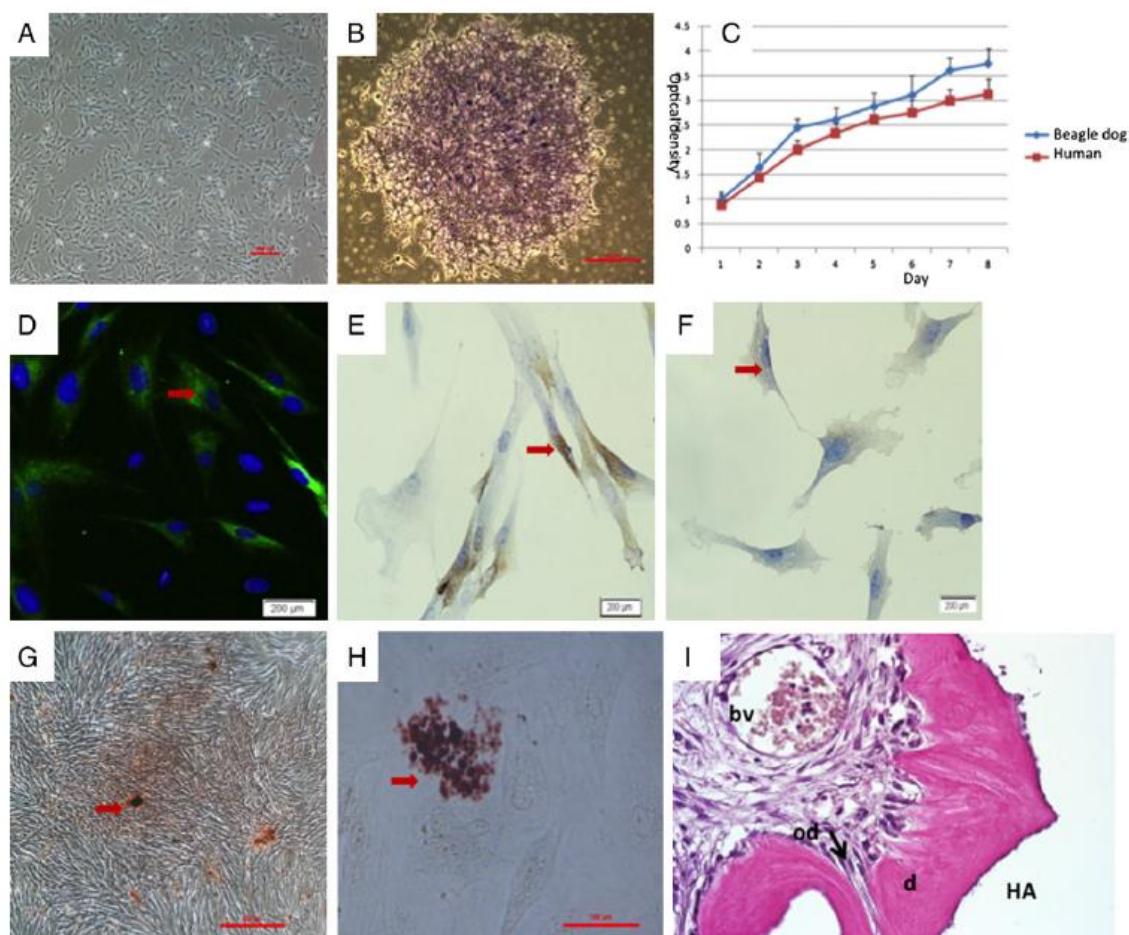


Figura 24. Caracterização das cDPSCs dos Beagles. cDPSCs com morfologia típica de fibroblasto (A). Formação de colónias celulares representativas após 7 dias em cultura (B). Taxa de crescimento das cDPSCs superior à das hDPSC (C). Expressão positiva para STRO-1 (D), ALP (E) e nestina (F) das cDPSC. Formação de nódulos mineralizados (G) e de

gotículas lipídicas (H) pelas cDPSC (como indicado pelas setas). Secção de corte dos transplantes das cDPSC, 8 semanas depois dos mesmos terem sido realizados (coloração HE). Superfícies de hidroxiapatite revestidas por uma matriz de dentina (d) rodeada por tecido pulpar com vasos sanguíneos (bv) e uma interface de células odontoblásticas (od) (I).

Após análise das cDPSC comprovou-se a presença de STRO-1, ALP, nestina, bem como a capacidade das células para se diferenciarem em múltiplas linhagens. As cDPSC colocadas em scaffold de pó de hidroxiapatite Gelfoam foram transplantadas para os canais radiculares dos incisivos definitivos com ápex aberto de rato. Após 6 semanas depois gerou-se uma estrutura dentinária com uma matriz de colagénio altamente organizada depositada perpendicularmente à camada de odontoblastos na superfície das partículas de hidroxiapatite. Houve regeneração do tecido pulpar com vasos sanguíneos e regeneração de tecido dentinário com as cDPSC implantadas nas raízes sem polpa e com ápex aberto dos modelos animais. Os odontoblastos tinham os seus prolongamentos citoplasmáticos dentro da matriz dentinária na interface do tecido intersticial com o tecido pulpar infiltrado por vasos sanguíneos. Com a análise clínica verificou-se ausência de mobilidade dentária e ausência de fístula (Tabela 6.). Com a análise radiográfica verificou-se desenvolvimento radicular completo, continuidade do comprimento radicular e encerramento do forâmen apical (Figura 25. e Tabela 7.).

Tabela 6. Avaliação clínicas dos 3 grupos, 24 semanas pós-cultura.

Group (no. of teeth)	Clinical assessment (24 weeks)			Radiologic evaluation (24 weeks)		
	Tooth mobility	Gingiva evaluation (swelling and fistula)	Restoration retention	Complete root development	Root wall thickening	Foramen closure
Group 1 (n = 6)	No	No	Good	6	6	6
Group 2 (n = 6)	No	No	Good	4	0	0
Group 3 (n = 6)	No	No	Good	0	0	0

Nenhum dos grupos apresentou mobilidade dentária nem desenvolveu fístula. Apenas o grupo 1 completou o desenvolvimento radicular com encerramento do forâmen apical e aumento da espessura da parede radicular.

Tabela 7. Avaliação radiográfica dos 3 grupos.

Group (no. of teeth)	Pretransplantation			24 Weeks		
	RL	FW	WT	RL	FW	WT
Group 1 (n = 6)	15.3 ± 0.09	1.51 ± 0.09	1.0 ± 0.07	18.7 ± 0.27	0.30 ± 0.07	3.0 ± 0.35
Group 2 (n = 6)	15.4 ± 0.09	1.48 ± 0.08	0.95 ± 0.07	15.6 ± 0.22	1.10 ± 0.07	1.0 ± 0.07
Group 3 (n = 6)	15.3 ± 0.09	1.55 ± 0.07	1.05 ± 0.06	15.5 ± 0.23	1.45 ± 0.07	1.08 ± 0.09

Medições pré-transplante e medições após 24 semanas de cultura. RL, comprimento radicular; FW, largura do forâmen apical; WT, largura da parede.

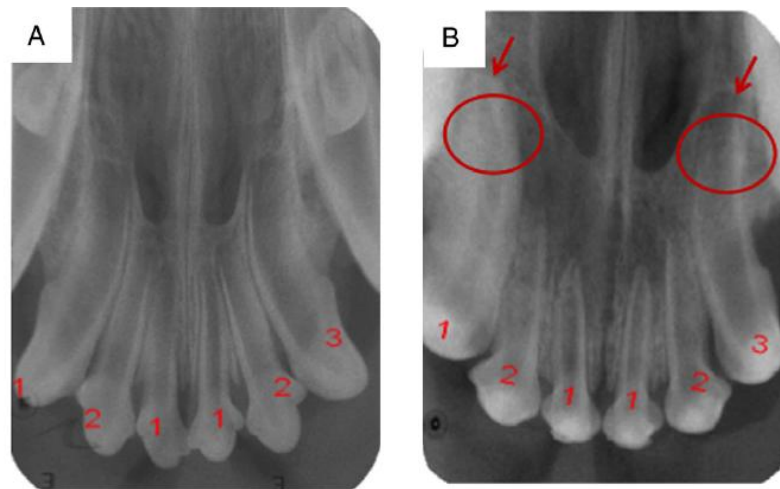


Figura 25. Radiografias pré e pós-operatórias. Radiografia pré-operatória que mostra os 6 incisivos superiores de 18 semanas imaturos, com o forâmen apical aberto e paredes dentinárias finas (A). Radiografia 24 semanas depois (B), a mostrar que o desenvolvimento radicular estava completo, o forâmen apical encerrado e a parede dentinária engrossada, nos 3 dentes do grupo 1. O mesmo não foi observado nos 3 dentes dos grupos 2 e 3 (como indicado pelas setas).

Por fim, com a análise histológica observou-se deposição da dentina ao longo da parede radicular interna, regeneração do tecido pulpar com vasos sanguíneos e regeneração de tecido dentinário (Figura 26.).

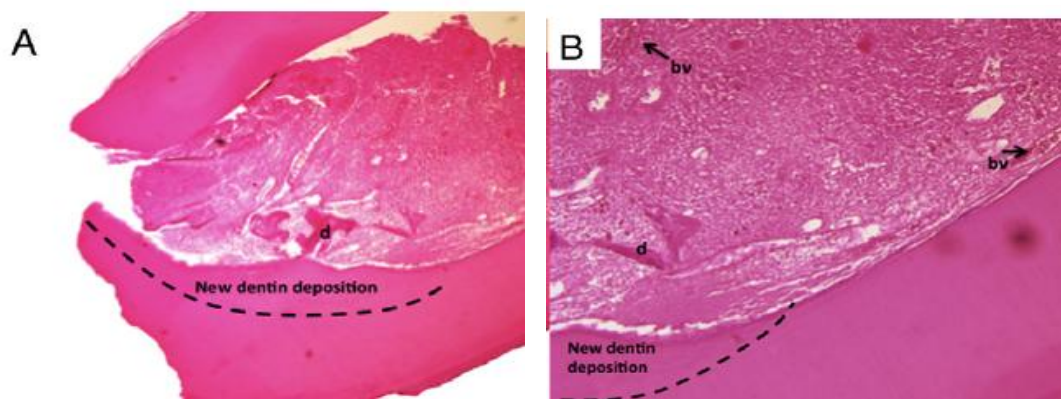


Figura 26. Avaliação histológica da regeneração de tecido pulpar com HE. Dentina regenerada depositada ao longo da parede radicular interna (A). Tecido pulpar regenerado com vasos sanguíneos (bv) e tecido dentinário (d) (B).

3.9. Por Attar, A., *et al.*, em 2013

Em 2013, uma equipa de investigadores iranianos verificou que DPSC isoladas de polpas diagnosticadas com pulpite hiperplásica crónica de quatro sisos de jovens humanos adultos, apresentavam células que possuíam os critérios mínimos das MSC, confirmando a presença de SC em polpas com pulpite. Nesta investigação, houve não só formação de colónias, proliferação, (Figura 27.), como diferenciação celular (Figura 28.) das DPSC isoladas da polpa inflamada. (Attar, A., *et al.*, 2013)

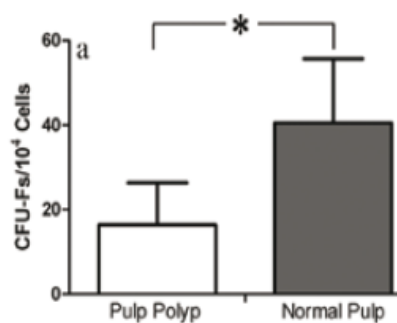


Figura 27. Comparação da formação de colónias pelas DPSC isoladas de polpa saudável e polpa diagnosticada com pulpite.

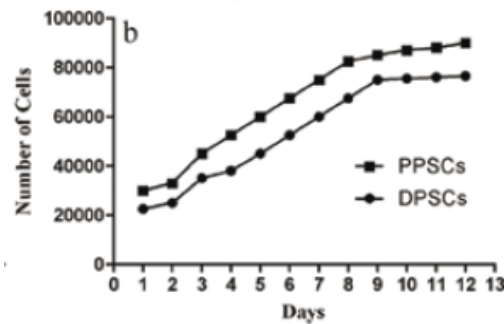


Figura 28. Comparação da diferenciação celular das DPSC isoladas de polpa saudável e polpa diagnosticada com pulpíte.

3.10. Por Horibe, H., *et al.*, em 2013

Uma equipa de investigação, japonesa, realizou em 2013, um trabalho com DPSC isoladas com base na sua resposta migratória ao G-CSF (factor de estimulação de colónias de granulócitos). As hDPSC foram isoladas de seis doentes jovens, entre 19 e 30 anos, e seis doentes mais velhos, entre 44 e 70 anos de idade, e foram colocadas em estruturas com forma de raiz de ratos, para comparação das suas características. Na presença de níveis elevados de factores tróficos verificaram uma elevada proliferação, migração e efeitos anti-apoptóticos, para ambas as populações celulares, positivas para os marcadores CD29, CD44, CD73 e CD90 e negativas para o marcador CD31. A diminuição das características estaminais, incluindo o potencial de migração e diferenciação, foi ligeiramente maior para as hDPSC de dadores mais velhos.

Assim sendo, uma vez que os resultados mostraram alterações mínimas nas DPSC dos dadores com mais idade, pode-se considerar que o potencial regenerativo das células estaminais da polpa de dentes definitivos é independente da idade do seu dador, permitindo a utilização clínica de células de dadores mais idosos em transplantes autólogos para regeneração pulpar (Horibe, H., *et al.*, 2013).

3.11. Por Iohara, K., *et al.*, em 2013

Também em 2013, Iohara, K., *et al.*, realizaram transplantes autólogos de células estaminais de polpa canina (cDPSC) juntamente com o factor de estimulação de

formação de colónias de granulócitos (G-SCF), após pulpectomia das raízes, a fim de verificar regeneração pulpar.

Depois de um corte longitudinal feito em caninos superiores extraídos de cães de raça Beagle com aproximadamente 9 meses de idade, foram recolhidas DPSC e tecido pulpar, com o objetivo de comparar as características das DPSC com as das células da polpa. As células foram mantidas numa solução de liberase (0,04mg/ml) onde sofreram digestão enzimática durante 30 minutos a uma temperatura de 37°C. Depois foram semeadas em placas numa concentração de 2 a 6×10^4 células e cultivadas no meio modificado de Eagle até atingirem uma confluência de 70%.

Os resultados obtidos mostraram formação de colónias com aproximadamente 90% de DPSC ao final de 10 dias de incubação (Figura 29. C.), com expressão positiva para o CD29, o CD44, o CD73, o CD90 e negativas para o CD31, característico das MSC.

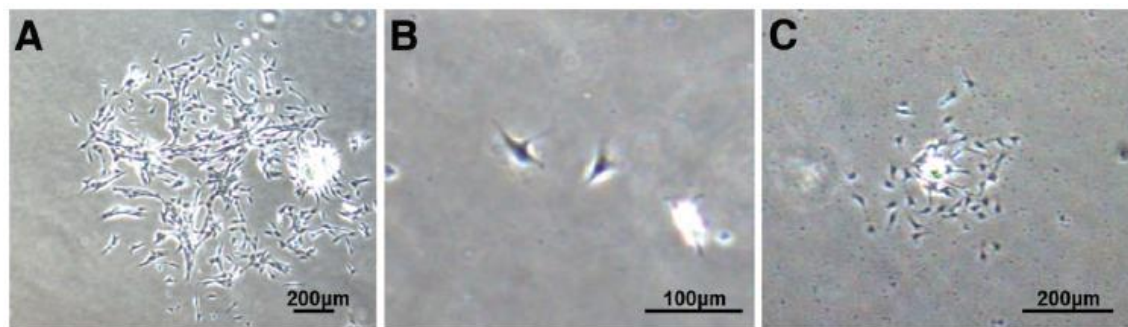


Figura 29. A.-C. Isolamentos das DPSC de um cão adulto. Células da polpa ao sétimo dia (A), DPSC ao segundo dia (B), e formação de colónias de DPSC ao décimo dia de cultura (C).

Para além disso, observou-se regeneração completa da raíz e do tecido dentinário depositado corono-radicularmente (Figura 30. A.-C. e E.) verificando-se uma actividade migratória elevada das DPSC (Figura 31. S.) para a parte apical da raíz antes de ocorrer a vascularização; uma elevada expressão de múltiplos factores tróficos que estimulam a migração e a proliferação das DPSC endógenas de tecidos e de vasos sanguíneos adjacentes (Figura 32. D.); expressão de propriedades imunossupressoras; diminuição do número de células inflamatórias e apoptóticas permitindo uma menor inflamação dos tecidos regenerados (Figura 33. K.); aumento significativo do volume de tecido regenerado, a angiogénese e a neurogénese *in vivo* (Figura 33. Q.-S., e Figura 34.). (Iohara, Y., *et al.*, 2013)

Tabela 8. Comparação da expressão de marcadores de superfície entre as DPSC e as células da polpa.

	Pulp stem cells		Total pulp cells	
	Positive (%)	SD	Positive (%)	SD
CD29	99.4	0.3	99.4	0.2
CD31	0.4	0.1	0.3	0.1
CD44	99.5	0.9	99.7	0.3
CD73	94.1	0.9	94.1	0.3
CD90	96.6	2.5	96.3	3.4
CD105	95.2 ^a	0.3	38.7	5.4
CXCR4	18.2 ^b	2.0	4.9	1.0
G-CSFR	71.5 ^a	3.6	19.6	3.9

^a $p < .01$ versus total pulp cells.

^b $p < .05$ versus total pulp cells.

Maior percentagem de CD105, CXCR4 e G-CSFR expressos pelas DPSC em comparação com as células da polpa. Os restantes marcadores celulares expressaram-se de forma semelhante em ambas as populações.

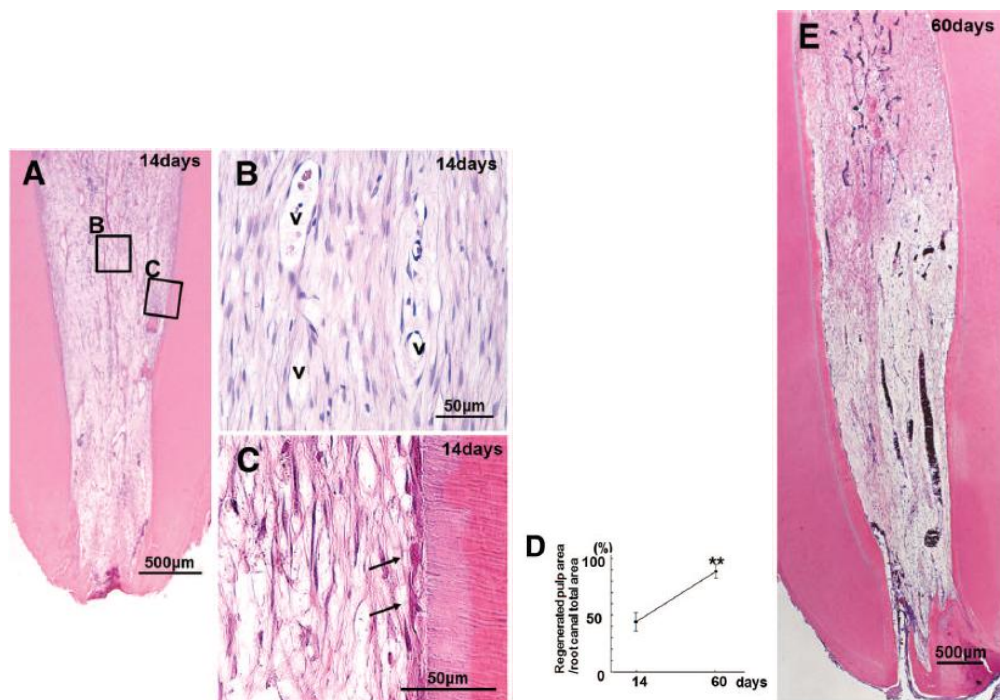


Figura 30.A.-E. Regeneração do tecido pulpar depois do transplante das DPSC com G-CSF para dentes de cão após pulpectomia. Tecido pulpar regenerado (A, B, C, E). Taxa de tecido regenerado nos dias 14 e 60 (D). As setas indicam os odontoblastos formados ao longo da nova osteodentina e dentina tubular formadas (C).

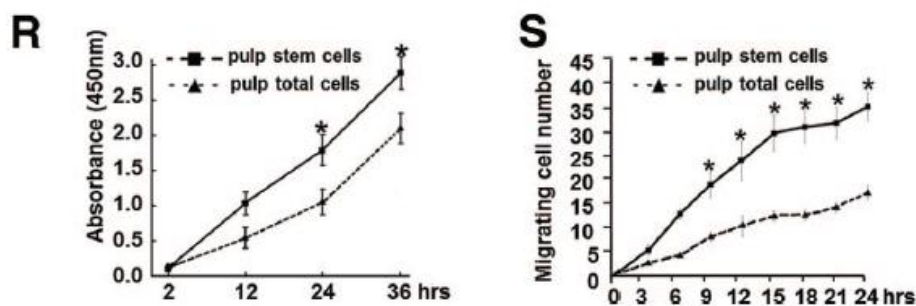


Figura 31. R. e S. Actividade proliferativa (R) e actividade migratória (S) das DPSC superior às das células da polpa, com G-SCF.

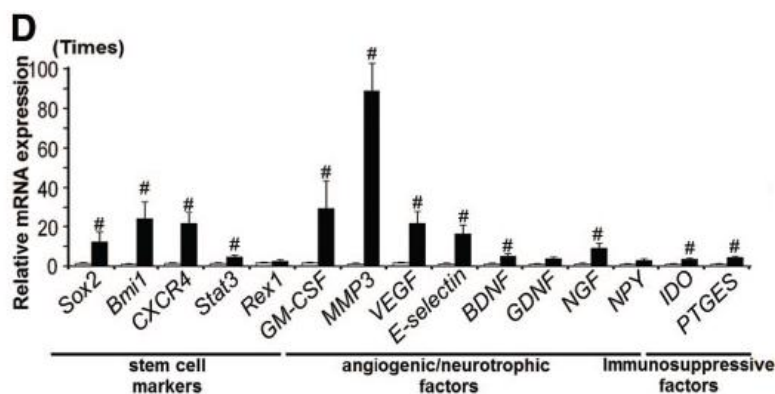


Figura 32. D. Expressão de marcadores celulares e factores tróficos pelas cDPSC com G-SCF.

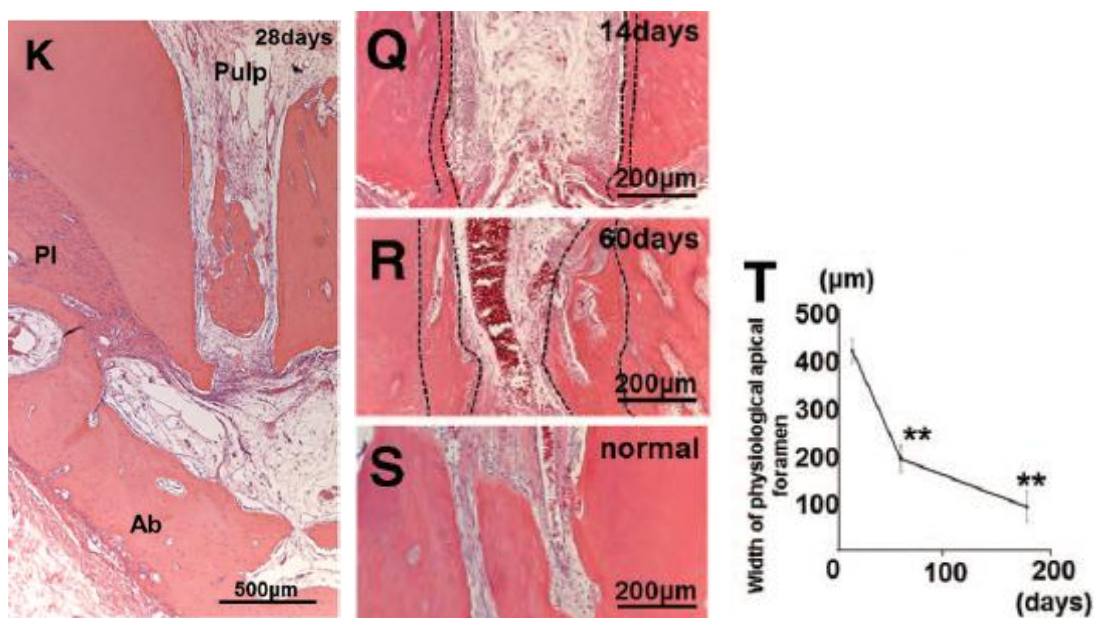


Figura 33. K.-T. Análise histológica da região periapical e gráfico da evolução do diâmetro apical . Região periapical sem infiltração, células inflamatórias e sem reabsorção interna e externa do dente ao vigésimo oitavo dia (K). Imagens tridimensionais da região apical (Q, R e S). Diminuição gradual do diâmetro do forâmen apical fisiológico (T) que demonstra progressiva maturação radicular.

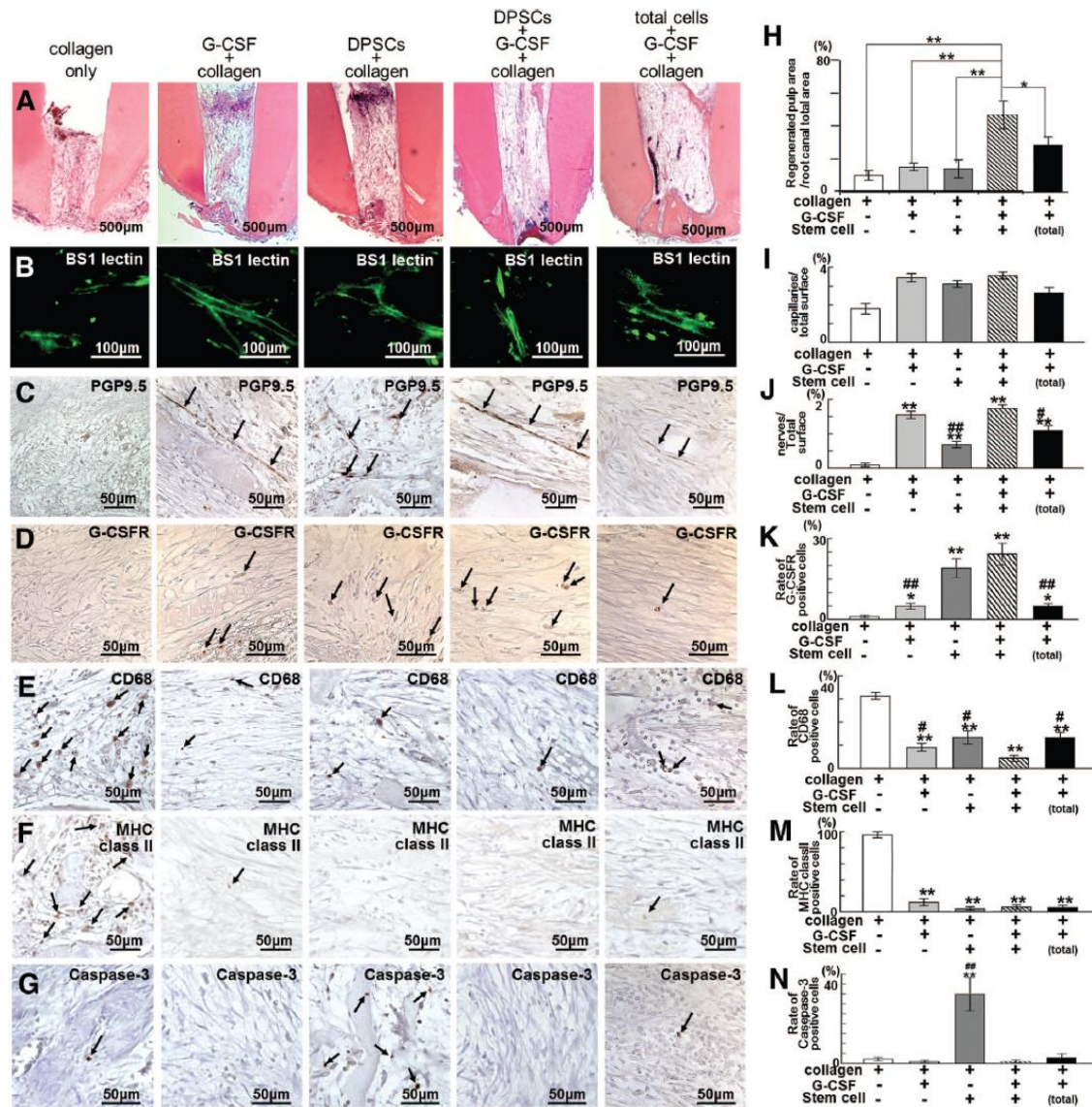


Figura 34. Efeito combinatório das DPSC e do G-CSF na regeneração do tecido pulpar. Análises histológicas do transplante das DPSC, G-CSF e colagénio a demonstrarem resultados mais positivos de regeneração tecidual, quando em comparação com os resultados demonstrados pelo transplante de apenas colagénio, de G-CSF com colagénio, e de colagénio com DPSC (A, B, C, D, E, F e G) e gráficos representativos da regeneração para as 5 amostras de células estaminais e proteínas (H, I, J, K, L, M e N), ao décimo quarto dia de cultura.

Este trabalho permitiu comprovar as inúmeras vantagens da utilização de G-SCF com DPSC (Figura 35.), bem como confirmar que as características das DPSC se mantêm ao longo do tempo, sem alterações irreparáveis, quando crioconservadas para posterior utilização.

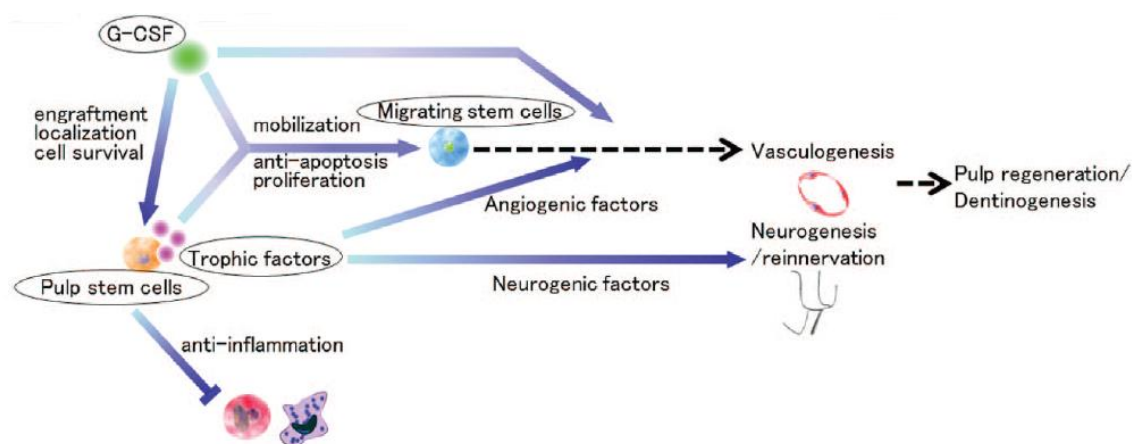


Figura 35. Diagrama dos efeitos do G-CSF e outros factores tróficos na regeneração de tecido pulpar e dentinário.

3.12. Por Zhou, Y., *et al.*, em 2014

Num estudo publicado em 2014, uma equipa de três investigadores confirmou que as DPSC mantêm em condições de hipoxia a sua capacidade de “stemness” ou seja a sua capacidade estaminal. Para isso compararam a expressão de marcadores de pluripotência como o OCT-4, o SOX2 e o c-Myc entre DPSC cultivadas em 20% e em 2% de O₂, sob condições de normoxia e hipoxia, respectivamente. O que estes investigadores verificaram foi que as DPSC aumentavam a expressão dos marcadores de pluripotência quando cultivadas em 2% de O₂, indicando que a hipoxia não altera a capacidade de diferenciação destas células. Os resultados obtidos estão de acordo com alguns estudos recentes que demonstravam que as SC estão localizadas num microambiente com taxas de oxigénio reduzidas (Zhou, Y., *et al.*, 2014).

3.13. Por Ueda, M., *et al.*, em 2014

Em 2014, o departamento de reabilitação oral e medicina regenerativa da faculdade de Okayama no Japão, liderado por Mayu Ueda, realizou um trabalho que permitiu confirmar que o factor tumoral de necrose-alfa (TNF- α) aumenta a capacidade de diferenciação e migração das DPSC, para além de aumentar o fenótipo de SC. As DPSC foram recolhidas da polpa de um rato vivo, incubadas com TNF- α durante 2 dias e implantadas num modelo do mesmo animal. Após análise confirmou-se que o número

de células positivas para os marcadores CD146, SSEA-4 (um antígeno do estadio embrionário 4), STRO-1 (marcador das MSC) (Figura 36. A.), juntamente com OCT-4 (marcador de pluripotência) e NANOG (marcador de pluripotência) (Feng, R., *et al.*, 2013) (Figura 37. C.) aumentou, devido ao tratamento a curto prazo com TNF- α (Ueda, M., *et al.*, 2014).

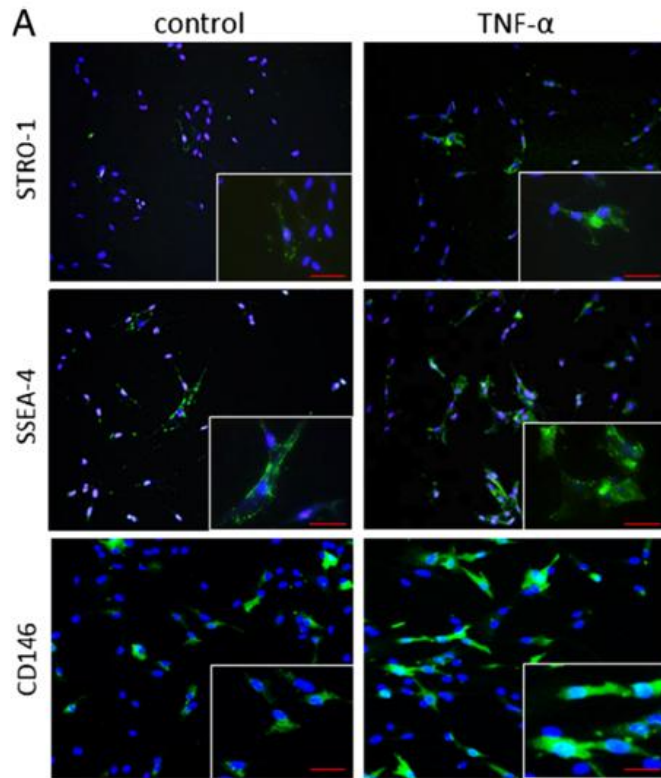


Figura 36. A. O tratamento com TNF- α aumenta o número de DPSC marcadas positivamente para o STRO-1, o CD146 e o SSEA-4.

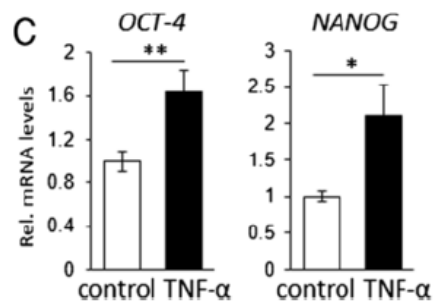


Figura 37. C. O tratamento com TNF- α aumenta a expressão de OCT-4 e NANOG pelas DPSC.

De facto, o TNF- α está envolvido em processos de proliferação, diferenciação e apoptose celulares, e numerosos estudos já demonstraram que este factor promove a potencial odontogénico das DPSC (Yu, S., *et al.*, 2014).

3.14. Por Han, N., *et al.*, em 2014

No início de 2014, um dos laboratórios de investigação da universidade de Wuhan na China, juntou sete investigadores que confirmaram que a β -catenina activa a Runx2 e outros marcadores de pluripotência, e pode elevar a capacidade de diferenciação das DPSC em odontoblastos (Figura 38. B).

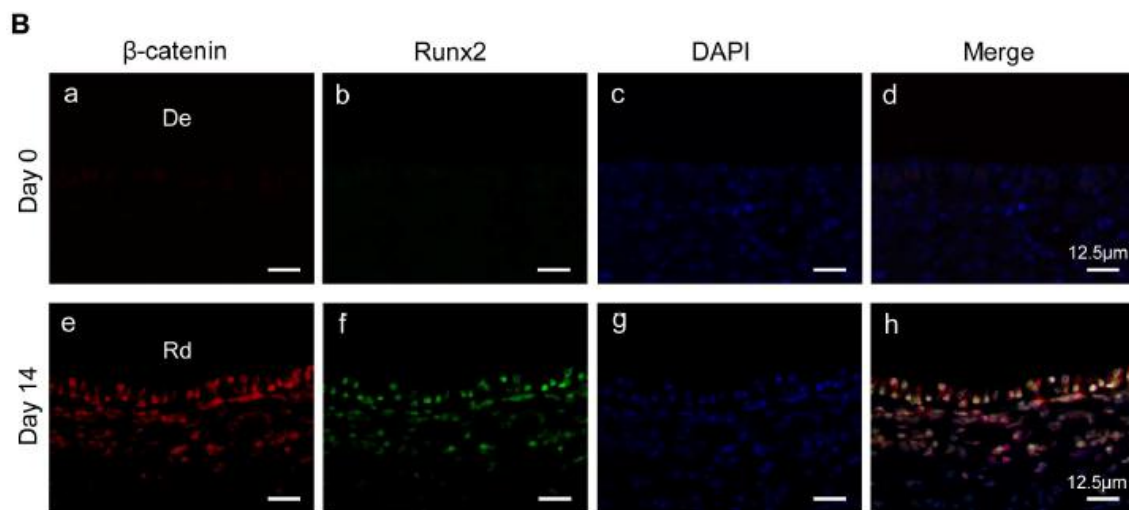


Figura 38. B. Coloração imunofluorescente para a β -catenina, Runx2, DAPI e Merge No primeiro dia de cultura (a-d) e no décimo quarto dia de cultura (e-h), respectivamente.

Esta equipa liderada por Nana Han, verificou que as DPSC e os odontoblastos obtidos a partir da diferenciação das DPSC *in vitro* têm a expressão da β -catenina significativamente aumentada, o que significa que a β -catenina tem acção na diferenciação dos odontoblastos. Nas DPSC cultivadas com β -catenina e LiCl a diferenciação de odontoblastos foi ainda mais aumentada (Figura 39.), uma vez que o LiCl provoca acumulação de β -catenina uma vez que bloqueia a actividade da quinase KSG-3, uma quinase que fosforila a β -catenina e desempenha funções na proliferação celular e apoptose (Han, N., *et al.*, 2014).

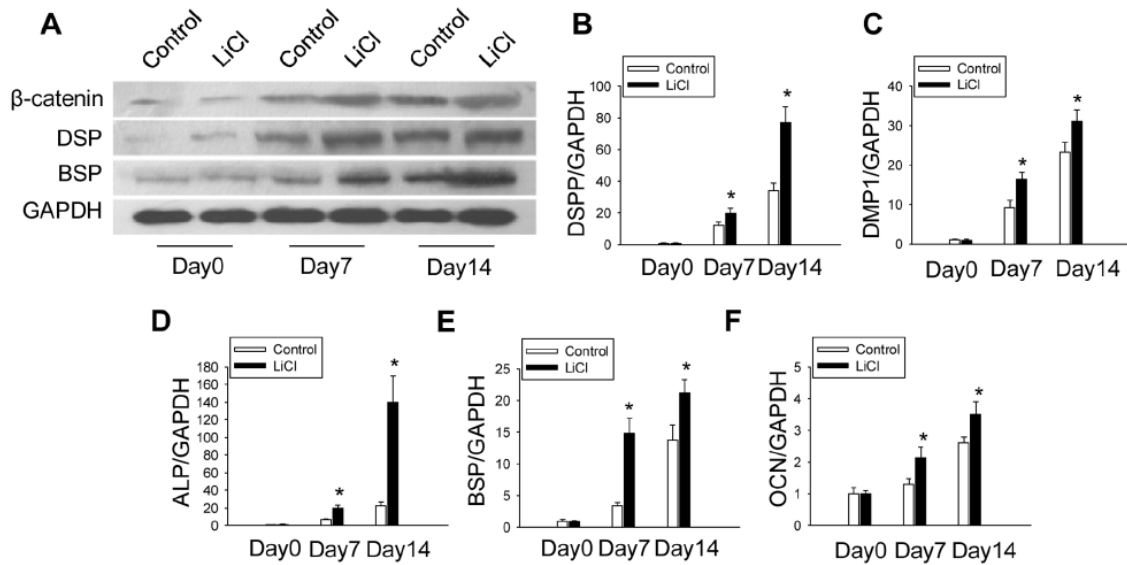


Figura 39. Expressão aumentada de marcadores celulares por acumulação de β -Catenina com tratamento de LiCl. Expressão de β -Catenina do grupo tratado com LiCl e no grupo de controlo, nos sétimo e décimo quarto dias de cultura (A). Expressão de DSPP (B), DMP1 (C), ALP (D), BSP (E) e OCN (F) aumentados ao longo dos dias de cultura, no grupo tratado com LiCl.

3.15. Por Choi, Y.-A., *et al.*, em 2014

Num outro estudo realizado em 2014, quatro investigadores verificaram que o factor de transcrição homólogo bobby-sox (BBX) é fortemente expresso durante a diferenciação *in vitro* de hDPSC isoladas de sisos humanos, extraídos por motivos ortodônticos e implantadas num modelo animal de rato, em odontoblastos. Este trabalho permitiu concluir que o gene BBX regula a diferenciação odontoblástica das hDPSC (Choi, Y.-A., *et al.*, 2014).

4. Investigações recentes com SHED

4.1. Por Miura, M., *et al.*, em 2003

Miura *et al.* foram quem primeiramente isolou, expandiu e caracterizou as SHED, SC da polpa dentária de dentes decíduos esfoliados. Os resultados relevantes desta investigação serão descritos em seguida.

As SHED representam uma população de ASC capazes de proliferação extensa e diferenciação multipotente. Os dentes decíduos esfoliados podem desta forma ser uma fonte ideal de SC para reparação de estruturas dentárias danificadas. As SHED são capazes de gerar dentina e induzir a formação de osso *in vivo*, não conseguem diferenciar-se directamente em osteoblastos mas induzem a formação de osso de novo através do recrutamento de células odontogénicas do tecido hospedeiro. hSHED são capazes de induzir a formação de osso após transplante para um rato imunocomprometido sem se diferenciarem directamente em osteoblastos, enquanto que rSHED têm capacidade para se diferenciarem em osteoblastos e adipócitos. Para além de derivarem de uma fonte tecidular muito acessível, são capazes de providenciar células suficientes para potenciais aplicações clínicas regenerativas. Em comparação com as BMSC e as DPSC, as SHED apresentam uma taxa de proliferação mais elevada e um tempo de duplicação de populações celulares mais rápido (Miura, M., *et al.*, 2003).

As SHED diferenciam-se das DPSC pela sua taxa de proliferação mais elevada, o seu tempo de duplicação celular é mais rápido, formam agrupamentos esféricos, possuem capacidade osteoindutiva *in vivo* e não conseguem restituir o complexo pulpo-dentinário, ou seja, diferem na sua capacidade de diferenciação odontogénica e de indução osteogénica.

SHED expandidas *in vitro* expressam os marcadores celulares mesenquimais STRO-1 e CD146, anteriormente descobertos nas BMSC e nas DPSC, outros marcadores mesenquimais e vasculares como FGF- β e endostatina, e ainda marcadores ósseos como ALP, MEPE, CBFA1 e sialoproteína do osso (aumentada em caso de indução osteogénica). Também por indução osteogénica, as SHED expressam DSPP e osteocalcina, o que indica a sua capacidade de diferenciação em odontoblastos *in vitro* e *in vivo* após transplante para um rato imunocomprometido (Miura, M., *et al.*, 2003).

As SHED *in vitro* expressam vários marcadores neuronais como: nestina, β III-tubulina, GAD, NeuN, GFAP, NFM e CNPases. Com indução neurogénica as SHED perdem a sua morfologia fibroblástica desenvolvendo prolongamentos multicitoplasmáticos. SHED injectadas no hipocampo de um rato imunocomprometido conseguiram sobreviver durante mais de 10 dias (demonstrado por coloração fluorescente de anticorpos mitocondriais humanos) mantendo a expressão de marcadores neuronais como o NFM.

As SHED expressam marcadores celulares das células da glia e dos neurónios, o que pode estar relacionado com a origem da polpa dentária, a crista neural. Estudos anteriores já tinham demonstrado que as BMSC são capazes de se diferenciar em células neuronais após transplante *in vivo*. Estas evidências demonstram que SC de origem não-neuronal são capazes de se diferenciar em células neuronais. Quando cultivadas, mesmo sob condições de indução neuronal, as SHED formam agrupamentos esféricos que aderem a um substrato ou se mantêm livres no meio de cultura. Depois de separadas dos agrupamentos esféricos, as células crescem como fibroblastos individuais (Miura, M., *et al.*, 2003).

Tal como com as DPSC, outros investigadores seguiram o legado de Miura *et al.*, o que fez surgir nos últimos anos observações actualizadas em relação à caracterização e potencialidades das SHED. Os resultados relevantes das investigações recentemente desenvolvidas serão apresentados em seguida.

4.2. Por Shi, S., *et al.*, em 2005

Shi *et al.*, isolaram e compararam DPSC, SHED, PDLSC e BMSC com o objectivo de verificar qual destas MSC possui maior capacidade proliferativa. E verificaram que as DPSC, as SHED e as PDLSC mantêm o seu potencial de crescimento elevado, mesmo após 100 duplicações (gerações). As BMSC começam a sofrer senescência quando atingem aproximadamente 50 duplicações.

A incidência elevada das DPSC na fase S do ciclo celular em contraste com as BMSC tem sido correlacionada com o aumento dos níveis da quinase ciclina-dependente 6 (activador do ciclo de divisão celular) e o factor de crescimento insulina-2 que medeia o ciclo celular de G1-S (Shi, S., *et al.*, 2005).

O potencial de crescimento das ASC *in vitro* é menor do que o das ESC, eventualmente devido à elevada expressão de telomerase (o complexo enzimático responsável pela manutenção do comprimento dos telómeros e estabilidade cromossomal durante a divisão celular) (Shi, S., *et al.*, 2005).

4.3. Por Cordeiro, M., *et al.*, em 2008

As hSHED foram recolhidas e transplantadas para um rato imunocomprometido num scaffold inserido numa lâmina/folha de terceiros molares humanos. As lâminas de dente humano forem recolhidas de doentes com entre 15 e 22 anos de idade, para posterior introdução do scaffold de PLA com SHED humanas juntamente com e sem células endoteliais. O tipo de scaffold aqui referido é o mesmo que indicado na Tabela 4. como “Scaffold de ECM com células”.

Observou-se expressão positiva de LacZ (gene que codifica para a β -galactosidase utilizado como marcador das hSHED) nas SHED presentes na área adjacente da pré-dentina, juntamente com inúmeros vasos sanguíneos funcionais, com a maioria destes vasos a mostrarem-se positivos para a expressão de LacZ o que mostra a capacidade das SHED se diferenciarem em vasos sanguíneos capazes de se anastomosarem com os vasos sanguíneos do tecido hospedeiro. As SHED revelaram-se capazes de formar uma rede microvascular, que é um requisito essencial para a regeneração do tecido pulpar. Isto foi observado na amostra de SHED co-cultivadas com células humanas endoteliais, resultando em tecido pulpar bem organizado com muitas células, como se verifica para a expressão positiva de LacZ pelas SHED (Figura 40). A rede microvascular que permite o influxo de nutrientes e oxigénio seguidos da sobrevivência e aumento da quantidade de células que formam o novo tecido regenerado não foi produzida nas amostras de SHED cultivadas isoladamente, ou seja, sem co-cultura de células endoteliais. Nestas amostras o número de vasos sanguíneos não aumentou significativamente durante o período de 14-28 dias de cultivo, o que pode significar que as SHED atingiram homeostase vascular durante esse período e portanto o número de vasos sanguíneos necessários para oxigenação é semelhante nos dois tempos (dia 14 e dia 28).

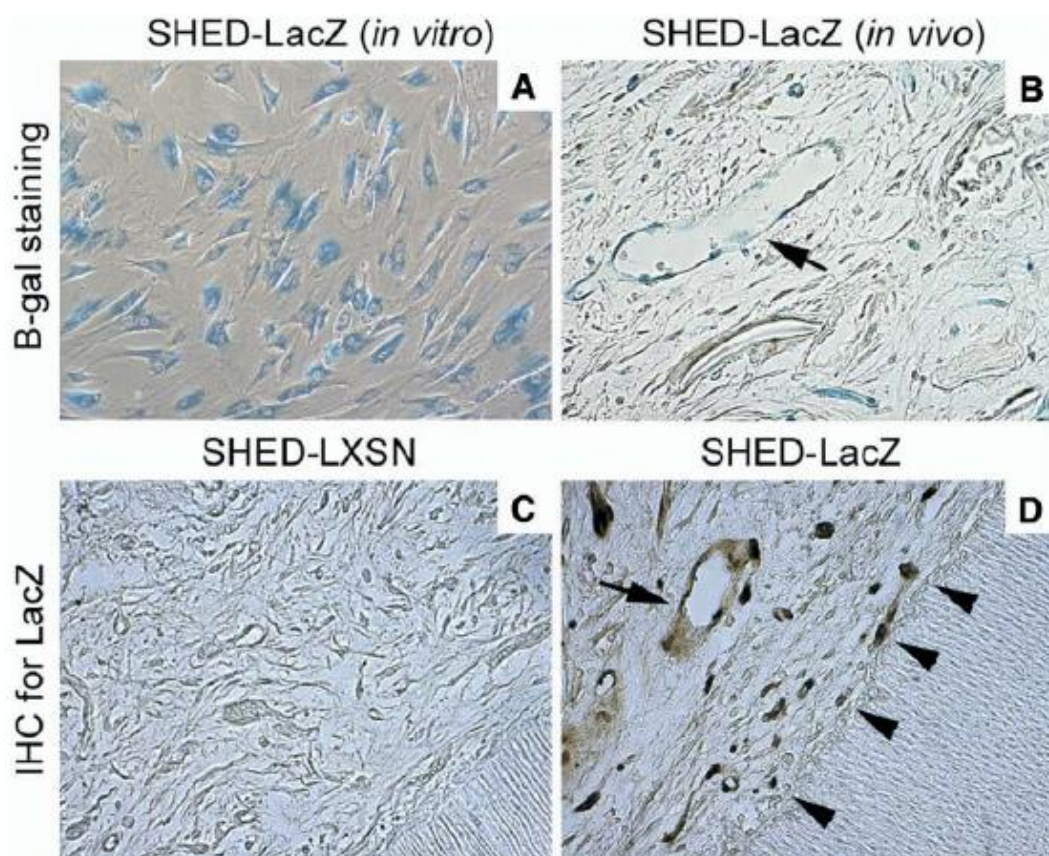


Figura 40. Diferenciação vascular e endotelial das SHED. SHED isoladas β-galactosidade diferenciam-se em células endoteliais (seta) *in vivo* (B), e SHED isoladas com LacZ diferenciam-se em vasos sanguíneos (seta) *in vivo* (D).

De facto, as SHED não foram capazes de formar uma estrutura vascular mas apenas de conectar alguns vasos sanguíneos com outros presentes no tecido do rato que serviu de modelo hospedeiro.

Uma das desvantagens do tipo de scaffold utilizado nesta investigação é o facto de ser quase impossível recriar exactamente a forma e o tamanho para a construção do tecido no processo de regeneração, uma vez que o mesmo é enxertado no local na forma de folha ou lâmina previamente fabricadas. Um scaffold injectável seria melhor opção, uma vez que pela bibliografia actual aparenta manter a mesma capacidade morfogénica do tipo de scaffold aqui utilizado.

Este trabalho demonstrou que as SHED podem ser isoladas de forma não invasiva e que mantêm as suas potencialidades após expansão *in vitro*, como a capacidade de auto-renovação e diferenciação multipotente.

As SHED transplantadas para o rato imunocomprometido e localizados na periferia do tecido hospedeiro, mostraram características de dentina activa, diferenciando-se em odontoblastos que expressam DSP. E apesar da DSP estar presente no osso, ela é 400 vezes superior na dentina, o que confirma a capacidade de diferenciação odontogénica das SHED. A presença de odontoblastos foram confirmados por análise microscópica destas células que revelaram polarização nuclear, presença de gap junctions e retículo endoplasmático bem desenvolvido (características típicas dos odontoblastos).

4.4. Por Casagrande, L., *et al.*, em 2009

Casagrande *et al.*, isolaram SHED em duas amostras, e cultivaram-as em meios diferentes: SHED isoladas e SHED cultivadas com dentina (SHED colocadas em discos dentários). Cada uma das duas amostras foram divididas em três placas diferentes, uma delas foi tratada com NaOCl durante 5 dias, outra colocada em EDTA a 10% durante 1 minuto e a 37°C, e a outra manteve-se intacta (grupo de controlo). As SHED cultivadas em scaffolds nos discos dentários foram transplantadas para um rato imunocomprometido.

Os resultados demonstraram que as SHED cultivadas sem dentina não expressaram marcadores de diferenciação odontoblástica, porém atingiram a taxa de proliferação mais elevada. AS SHED tratadas com hipoclorito de sódio apresentaram uma taxa de proliferação mais elevada do que as SHED tratadas com EDTA (Figura 41. C.).

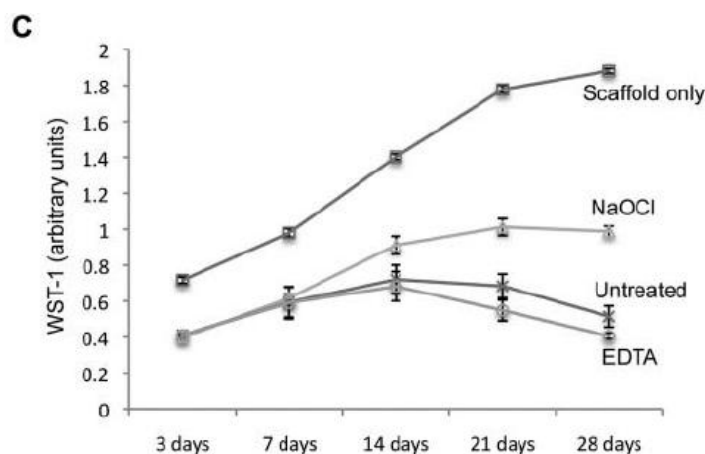


Figura 41. C. Taxa de proliferação das três amostras de SHED e do grupo de controlo (scaffold)

Contudo, as SHED cultivadas com dentina e tratadas com EDTA foram as únicas a expressar os marcadores: DPM-1, DSPP e MEPE, *in vivo* (Figura 42.). Nas culturas de SHED mantidas *in vitro* (Figura 43.) houve expressão de alguns marcadores nas amostras não tratadas e nas amostras tratadas com EDTA.

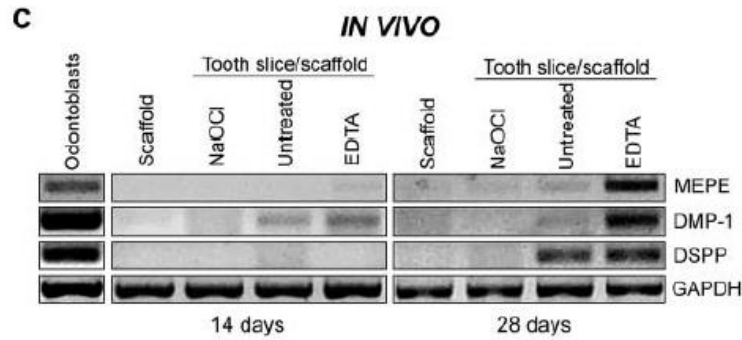


Figura 42. C. Expressão de marcadores odontogénicos pelas amostras de SHED *in vivo*

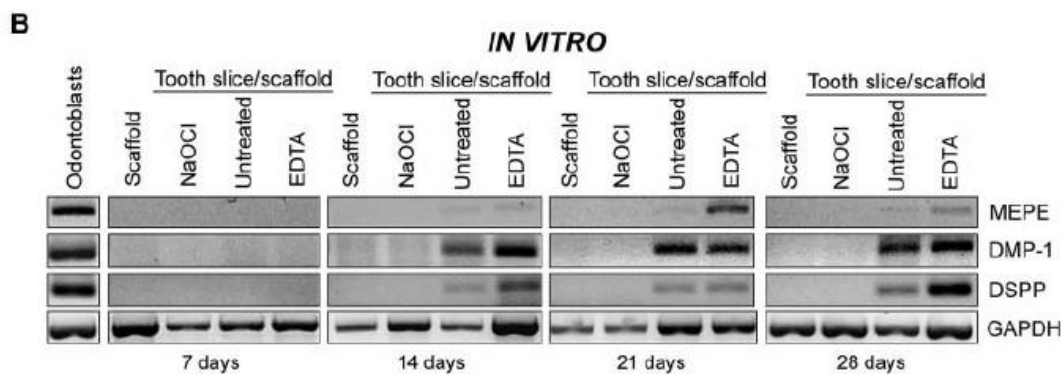


Figura 43. B. Expressão de marcadores odontogénicos pelas amostras de SHED *in vitro*

As SHED cultivadas com dentina às quais foi adicionado o hipoclorito não expressaram quaisquer marcadores uma vez que ocorreu desnaturação.

As SHED deste trabalho também expressaram BMP-IA, a BPM-IB e a BPM-II, sendo a BMP-II considerada necessária para a diferenciação das SHED em odontoblastos. É crítico compreender quais são as moléculas de sinalização dentinárias requeridas para a diferenciação odontoblástica. A dentina contém moléculas bioactivas capazes de estimular respostas celulares importantes na regeneração dentinária (Casagrande, L., *et al.*, 2009).

4.5. Por Nakamura, S., *et al.*, em 2009

Nakamura *et al.* isolaram hSHED e hDPSC de oito doentes aparentemente saudáveis e utilizaram BMSC para comparação de resultados, obtidas de um laboratório e posteriormente cultivadas seguindo os mesmos protocolos usados para as SC da polpa.

Por análise fluorescente confirmaram que as SHED apresentam maior taxa de proliferação *in vitro* do que as DPSC e as BMSC, o que as torna possíveis fontes para utilização em terapêuticas regenerativas (Nakamura, S., *et al.*, 2009).

Com a comparação dos perfis de expressão genética das SHED e das DPSC verificou-se a diferença entre 4386 genes de um total de 41078, que são expressos pelas SHED duas vezes mais do que pelas DPSC. Outros 2159 genes apresentam uma expressão aumentada nas SHED, enquanto que outros 2227 apresentam uma expressão reduzida nas SHED, em comparação com as DPSC.

Para além dessa diferença, os genes mais identificados nas SHED foram de forma geral os relacionados com a ECM, apesar de genes de vasos sanguíneos se apresentarem também elevados. A expressão de outros genes, como: FGF- β 2, colagénio tipo I, e colagénio tipo III estão significativamente aumentadas nas SHED em relação às DPSC. Para além disso identificaram-se certas citocinas, como: factor de crescimento fibroblástico 1 (FGF-1), factor transformante beta 2 (TGF- β 2), factor transformante beta 3 (TGF- β 3), factor de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF), proteína morfogénica do osso 1 (BMP-1) e interleucina 1-beta (IL-1 β) (Figura 44.) (Nakamura, S., *et al.*, 2009).

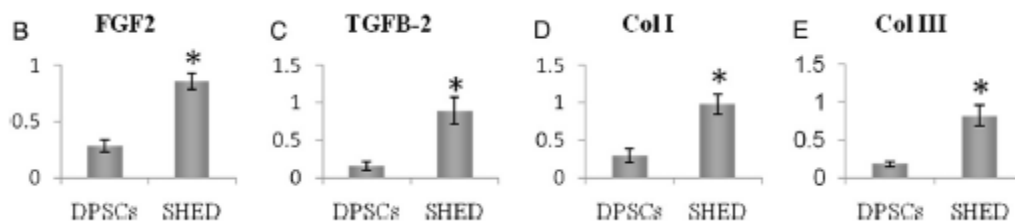


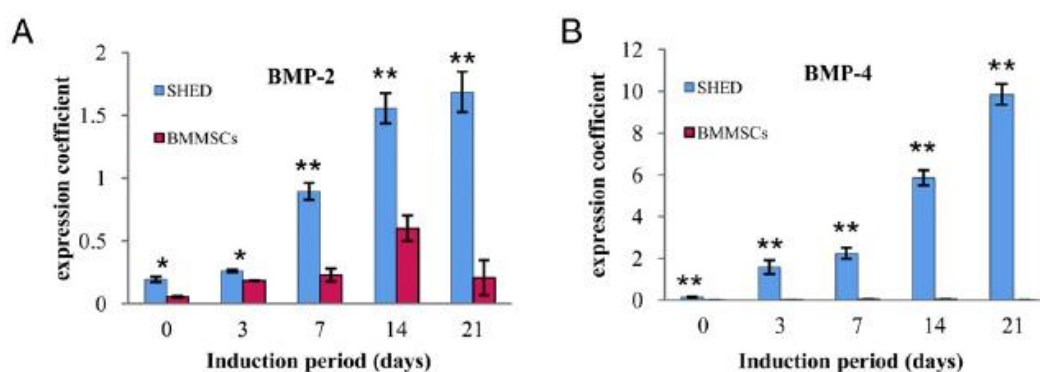
Figura 44. Comparação da expressão de alguns marcadores odontogénicos pelas hDPSC e hSHED. A expressão de FGF-2, TGF β -2, Colagénio tipo I e Colagénio tipo III foi mais elevada para as hSHED.

4.6. Por Coppe C., *et al.*, em 2009

Uma vez que os ameloblastos que originam as proteínas do esmalte são eliminados quando o esmalte sofre mineralização, ou seja logo após a erupção dentária, hipoteticamente a possibilidade de regeneração do esmalte com a utilização de células estaminais implicaria a utilização de SC embrionárias. Contudo, em 2009 Coppe *et al.* realizou um estudo *in vitro* com células da polpa de incisivos decíduos (SHED), isolou-as e colocou-as num meio com collagenase (4mg) e 10% de soro fetal de bovino. Processos imunohistoquímicos permitiram identificar as SHED por imunofluorescência usando os marcadores STRO-1 e CD146 que são expressos nestas células. Os resultados mostraram que aproximadamente 2% do total da população celular eram SC através de FACS STRO-1⁺. As SHED co-cultivadas com células do epitélio oral mostraram expressão de amelogenina, o que pode significar que as células estaminais da polpa de dentes decíduos esfoliados têm capacidade para se diferenciarem em ameloblastos, sugerindo-se o uso destas células heterogêneas em engenharia celular para regeneração de esmalte (Coppe, C., *et al.*, 2009).

4.7. Por Hara, K., *et al.*, em 2011

Em 2011, a equipa de investigadores liderada pelo japonês Kenji Hara, caracterizou SHED e SC da medula óssea na perspectiva de comparar as características destes dois tipos de MSC, e concluiu que as SHED utilizam BMP-4 para originar polpa e dentina regeneradas, além de BMP-2, Runx2, OCN e DSPP, e que a expressão destes factores é significativamente superior nas SHED em relação às BMSC (Figura 45. A.-E.), o que significa que as SHED têm uma expressão superior de genes odontogénicos (Hara, K., *et al.*, 2011).



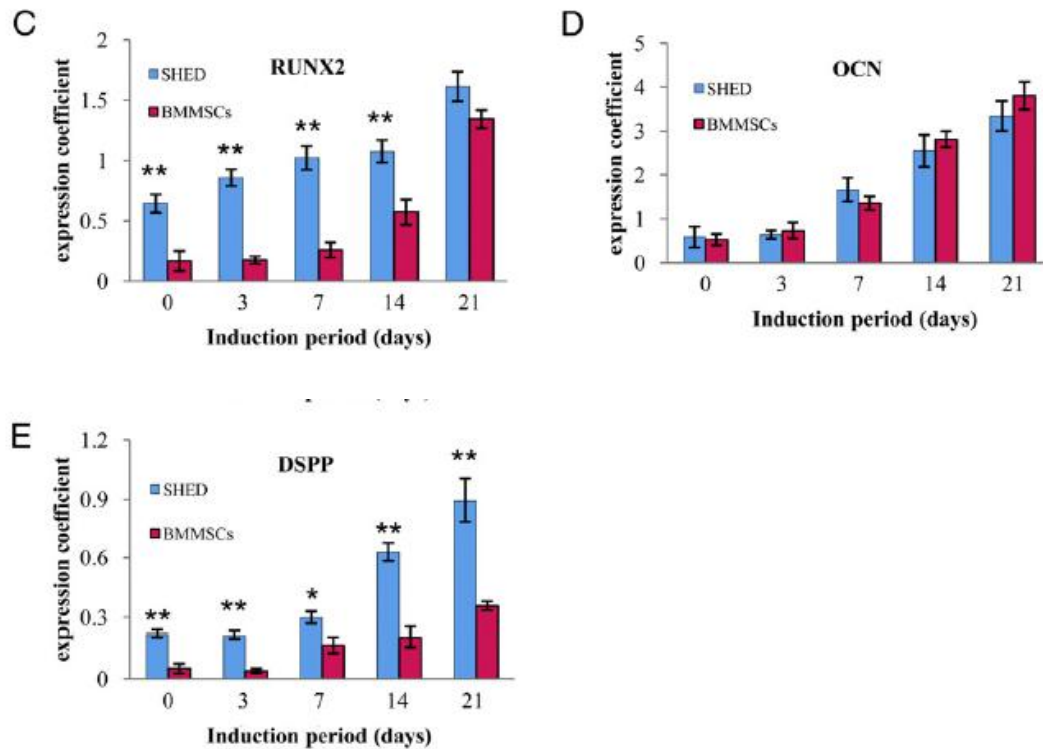


Figura 45. A.-E. Análise PCR da expressão de BMP-2, BMP-4, RUNX2, OCN e DSPP pelas SHED e pelas BMSC durante 21 dias de indução odontogénica (Hara, K., *et al.*, 2011).

4.8. Por Zheng, Y., *et al.*, em 2012

Em 2012, um grupo de investigadores chineses utilizou SHED de porco transplantadas por um modelo do mesmo animal e observou regeneração de dentina. As SHED foram obtidas de incisivos decíduos de 12 porcos com 6 a 7 meses de idade e crioconservadas para futura utilização. Depois de misturadas num scaffold de fosfato tricálcico-beta (β -TCP) foram testadas para obtenção da densidade óptima para regeneração dentinária (Figura 46.). Dezasseis semanas depois do transplante feito para os modelos animais de porco, as SHED foram capazes de gerar estruturas dentinárias (Figura 47.) (Zheng, Y., *et al.*, 2012).

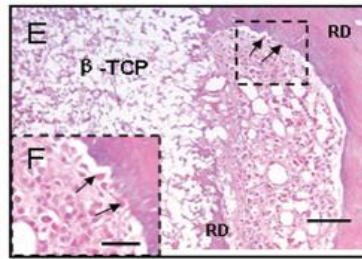


Figura 46. Análise de SHED de porco em dentina regenerada. Secção histológica da dentina regenerada (E). Scale bar: 50 μ m.

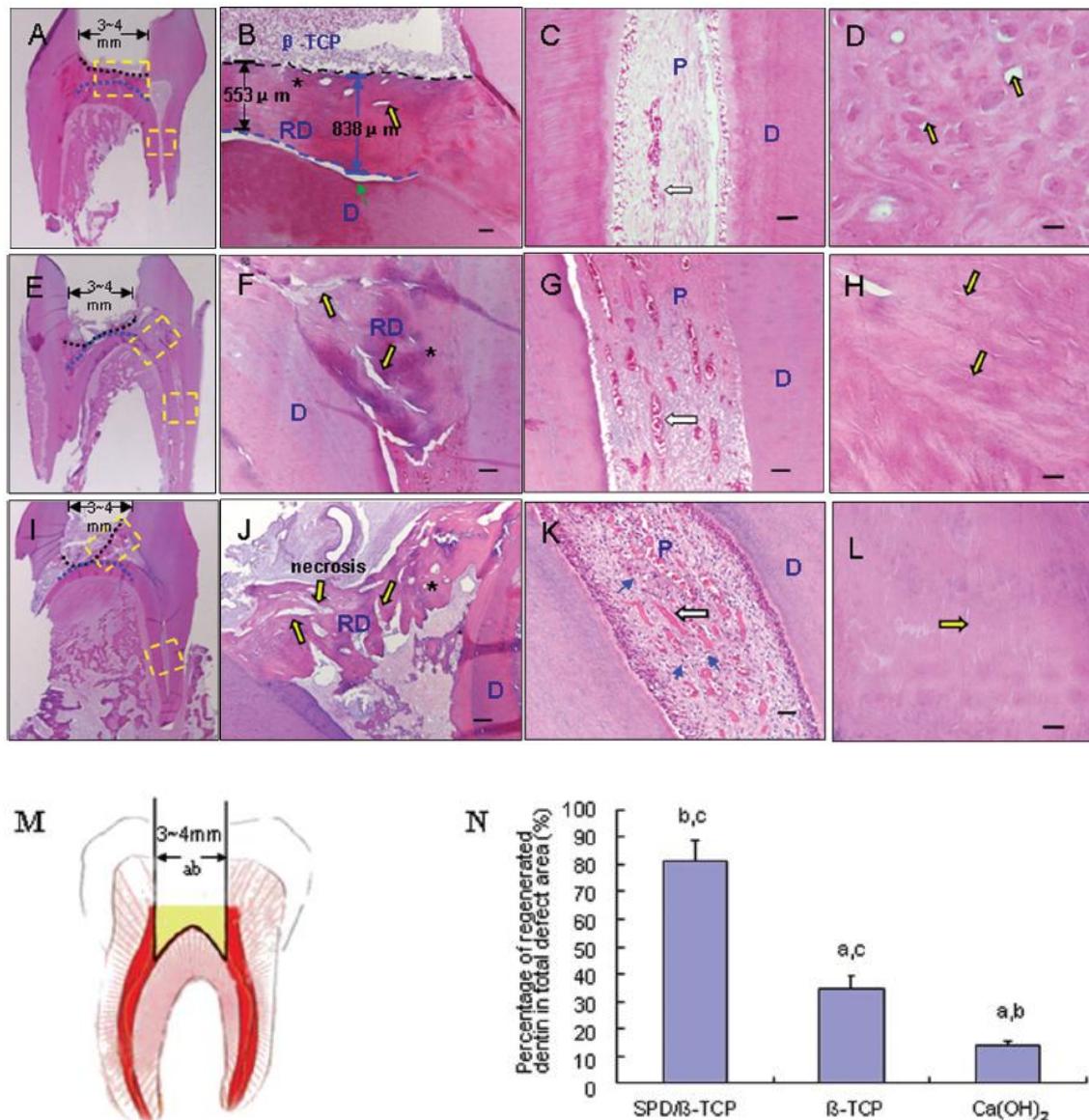


Figura 47. Análise histológica da regeneração de dentina pelas SHED de porco. Secção histológica da regeneração de dentina nos defeitos iniciais do chão da câmara pulpar numa vista mesio-distal, passadas 16 semanas do transplante com SHED de porco e β -TCP (A, B, C,

e D). A nova dentina formada é uniforme (A). A espessura da dentina formada é de 553-838µm. A seta amarela indica os escassos poros e a seta verde indica a junções entre a dentina e a dentina regenerada (B). Não se observou inflamação nem dilatação dos vasos sanguíneos (C). Formou-se osteodentina (D). No grupo de controlo com β -TCP (E, F, G, e H) a osteodentina formou-se apenas no orifício do canal radicular, não se formou dentina regenerada no chão da câmara pulpar (E). A dentina formada *de novo* apresenta fissuras ou poros (F). O tecido pulpar aparece com alguns vasos sanguíneos dilatados (G). Túbulos dentinários espaçados e irregulares (H). No grupo de controlo com hidróxido de cálcio (I, J, K, e L), a dentina recém-formada é mínima, insuficiente para cobrir o chão da câmara (I). A dentina reparadora tem estrutura tubular com uma espessura fina, poros e defeitos (seta amarela) (J). Muitas células inflamatórias (seta pequena azul) e dilatação dos vasos sanguíneos (seta amarela) (K). A dentina reparadora apresenta uma estrutura dentinária menos tubular (L). Dentina regenerada calculada na área de mineralização (região amarela), e secção de corte do scaffold implantado (dimensões do scaffold: 3x4x1mm) (M). Percentagem de dentina regenerada nas três amostras celulares: SHED com β -TCP, β -TCP e hidróxido de cálcio (N).

4.9. Por Rosa, V., *et al.*, em 2013

Em 2013, um grupo de investigadores realizou um estudo experimental para confirmar a hipótese das SHED conseguirem gerar tecido pulpar funcional quando injectadas ao longo de todo o comprimento dos canais radiculares. As SHED que sobreviveram expressaram, ao final do sétimo dia de cultura, marcadores de diferenciação odontoblástica. Algumas populações de SHED foram misturadas com um hidrogel peptídico de nome comercial *Puramatrix*, enquanto outras foram misturadas com hidrogel de colagénio tipo I humano recombinante de nome comercial *rhCollagen type I*, e posteriormente injectadas *in vitro* em canais radiculares de pré-molares humanos, extraídos por motivos ortodônticos a doente com idades entre os 12 e os 14 anos.

Estes canais radiculares injectados com SHED e scaffold injectável de *rhCollagen type I* e *Puramatrix* foram implantados em ratos imunocomprometidos, o que resultou na regeneração de tecido pulpar com a formação de novos odontoblastos (Figura 48 A., 7 days) com capacidade para formarem dentina tubular *de novo* ao longo dos canais radiculares (Figura 51. A.).

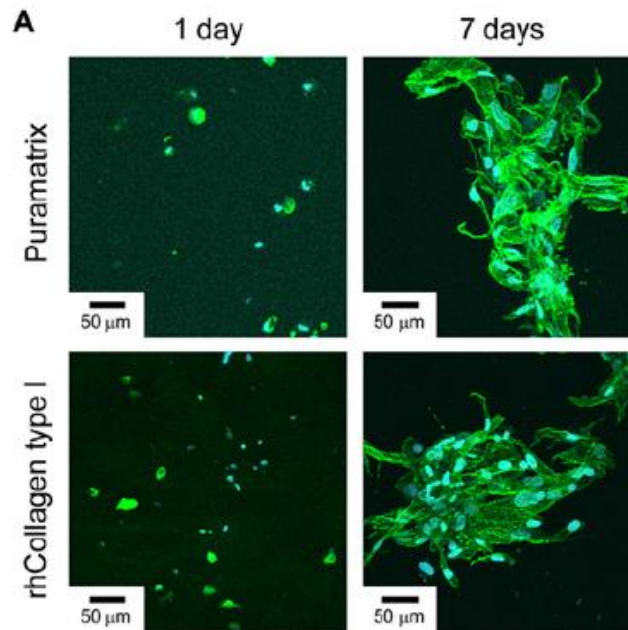


Figura 48. A. Morfologia e proliferação *in vitro* das SHED num scaffold injectável. Quando cultivadas em Puramatrix ou rhCollagen type I durante um dia, as SHED apresentam-se dispersas e com uma morfologia arredondada (A, 1 day). Ao fim de sete dias em cultura, as SHED proliferam, alongam-se, e formaram aglomerados. O núcleo aparece com coloração azul (A, 7 days).

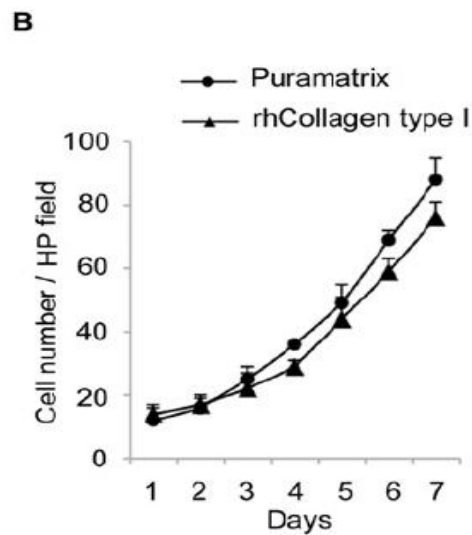


Figura 49. B. Proliferação das SHED ao longo dos setes dias de cultura quando misturadas com *Puramatrix* e com *rhCollagen tipo I*. O número de células não apresentou diferença estatística quando cultivadas com um ou outro scaffold, este valor foi determinado pelo teste *t* para $p > 0,5$.

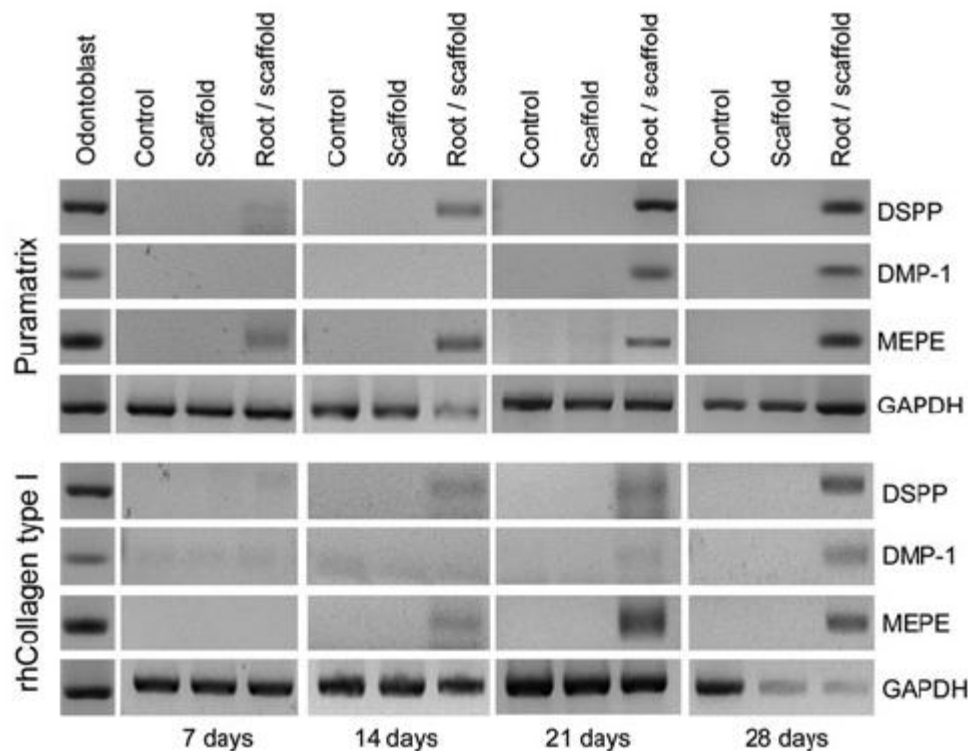


Figura 50. Expressão de marcadores osteogênicos: DSPP, DMP-1 e MEPE, pelas SHED em Puramatrix e pelas SHED em rhColágeno type I, nos dias 7, 14, 21 e 28 de cultura *in vitro*. A expressão destes marcadores revela-se semelhante para ambos os scaffold cultivados com SHED.

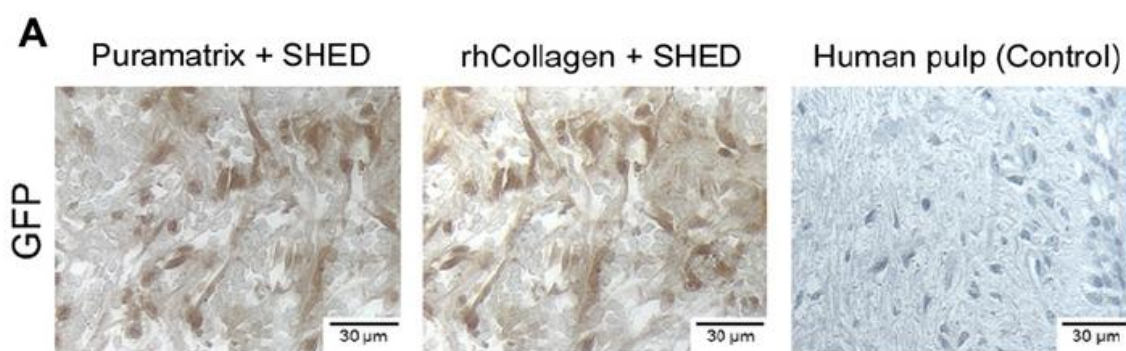
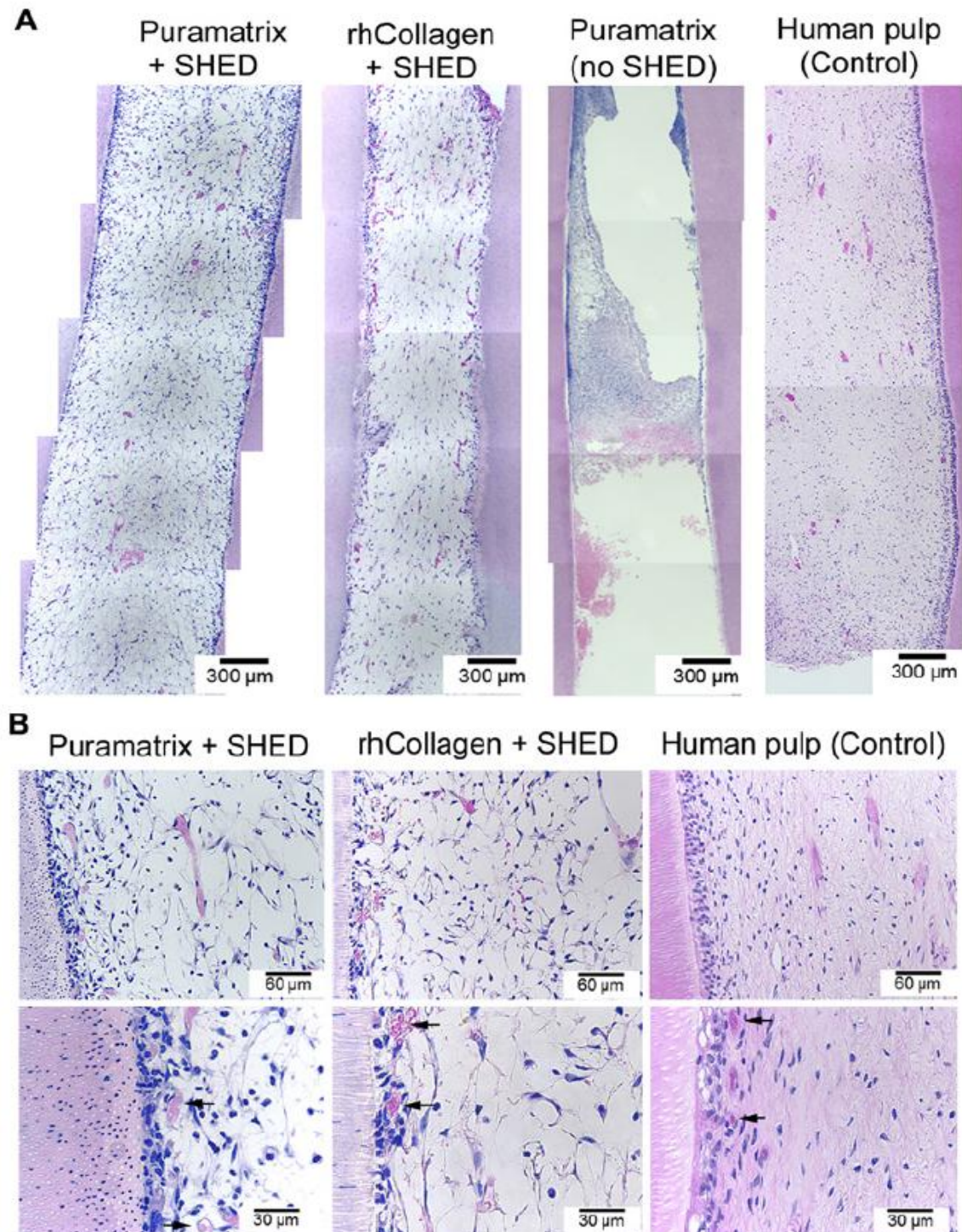


Figura 51. A. Caracterização das SHED nos scaffold *Puramatrix* e *rhCollagen* em comparação com o grupo de controlo (polpa humana). Estabilidade das SHED traduzida pela proteína verde fluorescente (GFP) quando misturada nos scaffold de *Puramatrix* ou *rhCollagen type I* e injectadas ao longo de todo o comprimento dos canais dos pré-molares humanos. A análise imunocistoquímica para a GFP (a castanho) confirma a formação tecidual (A).

Um estudo também de 2013 já tinha comprovado a capacidade do *Puramatrix* manter a viabilidade e suportar a diferenciação odontoblástica das DPSC *in vitro*, mas a investigação referida anteriormente permitiu verificar a capacidade das SHED originarem odontoblastos funcionais, uma vez que a polpa regenerada apresentava células e vascularização semelhantes àsquelas encontradas na polpa humana natural (grupo de controlo) (Figura 52.) (Rosa, V., *et al.*, 2013).



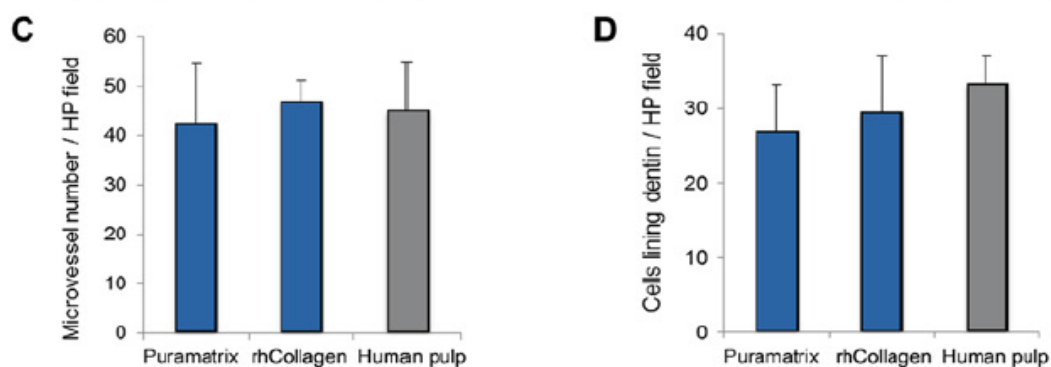


Figura 52. Caracterização das SHED injectadas nos canais radiculares humanos e consequente transplante para um rato imunocomprometido. SHED no scaffold *Puramatrix* e no scaffold de *rhCollagen tipo I*, em ampliação reduzida (A) e ampliação elevada (B). O tecido conjuntivo vascularizado ocupa toda a extensão do canal radicular. As setas pretas representam os vasos sanguíneos na camada odontoblástica (A e B). Ao longo das paredes de dentina é possível observar uma densificação microvascular (C) e celular (D) de vários vasos sanguíneos formados. As densidades microvascular e celular foram semelhantes às dos grupos de controlo (C e D).

4.10. Por Yu, S., *et al.*, em 2014

No primeiro semestre de 2014, uma equipa de investigadores chineses isolou SHED de polpas saudáveis e de polpas diagnosticadas com pulpíte irreversível, de 6 crianças chinesas com idades entre 3 e 10 anos, com o objectivo de comparar as características das populações celulares nestas duas situações. Com a investigação realizada confirmaram que as SHED das polpas diagnosticadas com uma inflamação, pulpíte irreversível, mantinham o seu potencial de regeneração, apesar de reduzido, em particular para tecido mineralizado. Não se verificaram diferenças significativas nos potenciais de diferenciação *in vitro* entre os dois tipos celulares em estudo, ambos possuíam morfologia típica de fibroblasto, para além de se mostraram positivas para os marcadores celulares CD105 (endógeno do receptor TGF- β), CD90 (antigénio de superfície celular thy-1) e CD146 (molécula de adesão celular de melanoma), também os factores inflamatórios, as interleucinas IL-1 β , IL-6 e o TNF- α (factor de necrose tumoral - alfa) expressaram-se em níveis semelhantes, apesar do TNF- α ter sido superior para as SHED de polpa inflamada.

Esta equipa concluiu que as SHED de polpa inflamada também são uma fonte potencial de células estaminais mesenquimatosas (MSC) para regeneração dentária, uma vez que o seu potencial dentinogénico *in vitro* se revelou semelhante aos das SHED isoladas de polpas saudáveis (Yu, S., *et al.*, 2014).

5. Criopreservação e Bancos de SC dentárias

Há duas formas de criopreservar as DPSC: mantê-las em nitrogénio líquido a uma temperatura de -150°C que permite a conservação e consequentemente o seu potencial uso futuro, ou, utilizando um campo magnético que mantém as células estaminais abaixo dos 0°C num processo de congelamento magnético que assegura igualmente a manutenção da viabilidade sem causar danos na parede celular (Rai, S., *et al.*, 2013).

O método de congelamento magnético foi testado por uma equipa da universidade de Hiroshima no Japão que obteve uma taxa de sobrevivência superior a 83% para as DPSC (Rai, S., *et al.*, 2013).

As DPSC mantém as suas características durante anos depois de criopreservadas independentemente como DPSC e não como polpa (La Noce, M., *et al.*, 2014).

Dado que os dentes decíduos têm sido indicados como uma fonte potencial de SC, é possível a criação de um futuro banco de células estaminais de origem dentária através da conservação das SHED (Hacking, S. A., *et al.*, 2009). Já existem quatro bancos licenciados para criopreservação das SC dentárias: o "Three Brackets" na universidade de Hiroshima, no Japão; o "bioEden" no Texas, Estados Unidos; o "banco dentário norueguês" na Noruega; e o "stemade biotech", na Índia (Rai, S., *et al.*, 2013).

5.1. Investigação desenvolvida por Ma, L. *et al.*, em 2012

Em 2012, Lan Ma *et al.*, criopreservaram células isoladas de crianças com idades entre os 5 e os 7 anos de idade, a -80°C num meio com 10% de dimetil-sulfóxido e 90% de soro de bovino fetal antes de serem transferidas para um meio de nitrogénio líquido onde ficaram armazenadas durante mais de dois anos. Passados 30 meses, metade das SHED da amostra, foram transplantadas para um modelo fêmea de rato com 6 semanas de idade (seguindo-se o mesmo protocolo para as SHED acabadas de obter), enquanto que a outra metade das SHED congeladas foi mantida *in vitro* para posterior comparação das características destas 3 populações celulares. Antes de analisadas, as SHED foram colocadas a 37°C (Ma, L., *et al.*, 2012).

Os resultados mostram que a formação de colónias foi semelhante na SHED-crio (SHED congeladas) (Figura 54. B) e nas SHED-fresh (SHED acabadas de recolher), mantendo as primeiras um nível elevado de capacidade proliferativa, para além de ambas expressarem os seguintes marcadores celulares: STRO-1, CD146, CD73, CD105,

CD90, NANOG, OCT-4, factor de crescimento neural, Nestin e Notch1. Depois de 4 semana de indução odontogénica, as SHED-crio formaram nódulos, mostraram uma actividade de ALP elevada, e expressaram genes específicos dos odontoblastos como a osteocalcina e a sialoproteína (Ma, L., *et al.*, 2012).

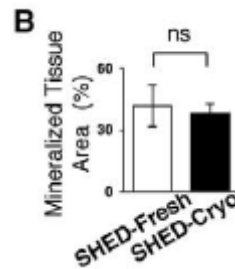


Figura 53. B. Formação de tecidos mineralizados pelas SHED-fresh e pelas SHED-crio.

Este estudo permitiu demonstrar que as SHED-crio preservam as características de MSC, tal como as SHED-fresh, pois já se verificou que as células criopreservadas até 30 meses, conseguiram manter propriedades de SC similares como clonagem, multipotencia, auto-renovação, e expressão de marcadores celulares (Figura 56.), tanto *in vitro* como pós transplante *in vivo*, às SHED recentemente isoladas. Ao mesmo tempo que mantiveram uma actividade de telomerase semelhante às SHED-fresh, o que permitiu confirmar a estabilidade genética (Figura 55. J.) das SHED-crio, demonstrando serem uma potencial fonte de SC para regeneração (Ma, L., *et al.*, 2012).

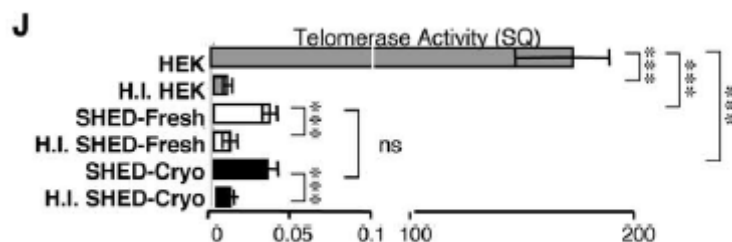


Figura 54. J. As SHED-crio conseguiram manter uma actividade de telomerase semaelhante às SHED-fresh.

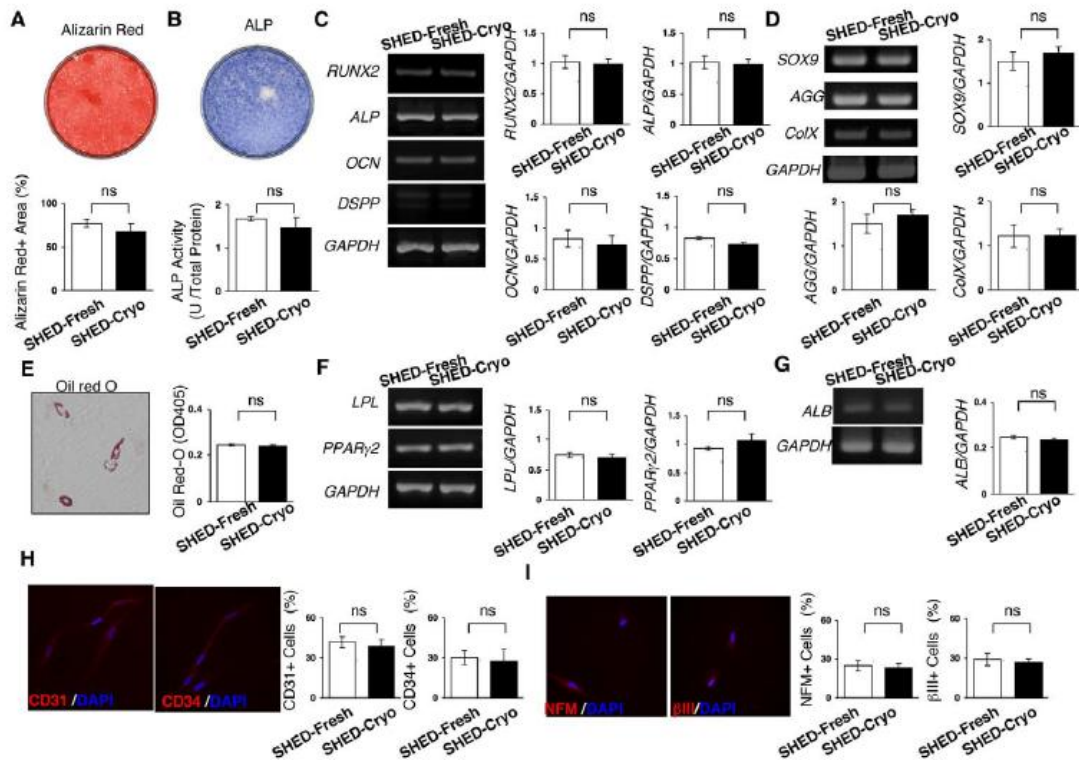


Figura 55. Comparação da expressão de marcadores de diferenciação osteogénica e odontogénica pelas SHED-crio e SHED-fresh. Expressão de marcadores de diferenciação osteogénica: coloração de alizarina red para comprovar a formação de colónias (A), actividade da ALP (B e C), Runx2, OCN, DSPP (C), expressão de marcadores de diferenciação odontogénica: Sox9, AGG, Col. X (D), expressão de marcadores de diferenciação adipogénica: CD405 (E), LPL, PPAR γ 2 (F), ALB (G), expressão de marcadores de diferenciação endotelial: CD34 (H), e expressão de marcadores de diferenciação neural: NMF (I).

III. CONCLUSÃO

A utilização de DPSC para regeneração tecidual dentária é um processo complexo e multidisciplinar. A recolha de células estaminais dentárias tornou-se um processo relativamente fácil que permite a utilização destas células para processos regenerativos (Casagrande, L., *et al.*, 2011).

As BMSC são as SC mais estudadas até hoje, são precursores de osteoblastos conhecidos, contudo a sua capacidade de diferenciação odontogénica fica àquém das SC da polpa. Gronthos *et al.* foram os primeiros a isolar ASC dentárias que se revelaram como progenitores de tecido pulpar (Gronthos, S., *et al.*, 2000)

O uso de DPSC oferece várias oportunidades terapêuticas e permitirá o tratamento de condições dentárias actualmente inconcebíveis em relação aos materiais e procedimentos que temos actualmente à disposição. Deste modo, a regeneração tecidual dentária é um campo de actuação que potenciará uma transformação na forma como praticamos medicina dentária (Casagrande, L., *et al.*, 2011).

As hDPSC demonstraram em diversas investigações desenvolvidas nos últimos anos a sua capacidade de diferenciação em odontoblastos funcionais *in vivo*, com geração do complexo pulpo-dentinário *in vivo* após transplante para modelo animal (Gronthos, S., *et al.*, 2000)

As hSHED representam uma população de ASC capazes de proliferação extensa e diferenciação multipotente. Os dentes decíduos esfoliados podem desta forma ser uma fonte ideal de SC para reparação de estruturas dentárias danificadas. As SHED são capazes de induzir a formação de osso e de gerar dentina. As SHED não só derivam de uma fonte tecidual muito acessível como são capazes de providenciar células suficientes para potenciais aplicações clínicas regenerativas. A sua principal desvantagem centra-se na incapacidade em gerar tecido pulpar funcional (Miura, M., *et al.*, 2003).

A possibilidade de se usarem células estaminais terapeuticamente para recuperar ou substituir tecidos lesados é um incentivo para realizar estudos que permitam reconhecer e cultivar estas células de capacidades notáveis encontradas em vários tecidos animais adultos. (Lodish, H., *et al.*, 2005) As SC têm propriedades biológicas importantes, pelo que se tem assistido a um progresso rápido no uso destas células para regeneração dentária. Mas há ainda obstáculos a ultrapassar até a regeneração com células ser uma prática acessível aos médicos dentistas (Volponi, A., *et al.*, 2010), como o

desenvolvimento de novas investigações eficazes no conhecimento das moléculas bioactivas necessárias aos processos regenerativos dentários, para além da construção de melhores scaffold comercializados a preços razoáveis (Chan, B., e Leong, K., 2008).

1. Viabilidade e perspectivas da utilização de células estaminais dentárias.

O desenvolvimento de terapêuticas com células estaminais depende da sua capacidade de amplificação *in vitro* em larga escala que pode estar associada a instabilidade genética (Atari, M., *et al.*, 2012). Um dos aspectos a melhorar para se tornar possível a prática clínica com SC é a sua taxa de sobrevivência, uma vez que a capacidade proliferativa das células em cultura vai diminuindo progressivamente (Huang, A., *et al.*, 2009).

Uma das dificuldades a considerar quando pensamos na transformação destes estudos em procedimentos clínicos são os custos a ela associados, e não falamos só do custo dos tratamentos em si, mas também das tecnologias necessárias, das instalações necessárias para a realização e manutenção de bancos de crioconservação, e da necessidade de se fabricarem scaffolds a preços razoáveis (Rosa, V., *et al.*, 2011).

O progresso da engenharia tecidual na utilização de SC está dependente da colaboração entre investigadores e clínicos, com o objectivo comum de desenvolverem novas abordagens (Casagrande, L., *et al.*, 2011). É esperado o estabelecimento de métodos de regeneração do complexo pulpo-dentinário seguros e reprodutíveis contendo tecido pulpar não mineralizado (Kawashima, N., 2012). A regeneração do complexo pulpo-dentinário com SC pode ser clinicamente possível, apesar de não poder ser aplicável em todos os casos clínicos como no caso de câmaras pulpares demasiado pequenas (Rosa, V., *et al.*, 2011). Um dos desafios críticos da regeneração pulpar é conseguir gerar uma rede vascular funcional tendo em conta as restrições anatómicas da polpa, uma vez que toda a vascularização dentária tem acesso radicular apenas pelo forâmen apical (Casagrande, L., *et al.*, 2011).

O enxerto com hDPSC autólogas é extremamente difícil, implica processos longos e extremamente caros, por isso é que não existem ainda muitos ensaios clínicos (La Noce, M., *et al.*, 2014).

IV. BIBLIOGRAFIA

- Alge, D., Zhou, D., Adams, L., Wyss, B., Shadday, M., Woods, E., Chu, T. e Goebel, S. (2010). Donor-matched comparison of dental pulp stem cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells in a rat model. *J Tissue Eng Regen Med.* 2010 January. 4(1):73-81. Doi:10.1002/term.220.
- Atari, M., Gil-Recio, C., Fabregat, M., García-Fernández, D., Barajas, M, Carrasco, M. A., Jung, H.-S., Alfaro, F. H., Casals N., Prosper, F., Ferrés-Padró, E. e Giner, L. (2012). Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *Journal of Cell Science* 125, 3343-3356. Doi:10.1242/jcs.096537.
- Attar, A., Eslaminejad, M.-B., Tavangar, M.-S., Karamzadeh, R., Dehghani-Nazhvani, A., Ghahramani, Y., Malekmohammadi, F. e Hosseini, S.-M. (2013). Dental Pulp Polyps Contain Stem Cells Comparable to the Normal Dental Pulps. *J Clin Exp Dent.* 2014;6(1):e53-9. Article number: 51305. Doi:10.4317/jced.51305. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4317/jced.51305>.
- Balic, A., Aguila, H., Caimano, M., Francone, V. e Nima, M. (2010). Characterization of stem and progenitor cells in the dental pulp of erupted and unerupted murine molars. *Bone*, 2010 June: 46(6):1639-1651. Doi:10.1016/j.bone.2010.02.019.
- Casagrande, L., Demarco F., Zhang, Z, Araujo, F., Shi, S. e Nor, J. (2010). Dentin-derived BMP-2 and Odontoblast Differentiation. *J Dent Res.* Doi:10.1177/0022034510364487.
- Casagrande, L., Cordeiro, M., Nor, S. e Nor, J. (2011). Dental pulp stem cells in regenerative dentistry. *Odontology*, 2011, 99;1-7. The Society of the Nippon Dental University. Doi:10.1007/s10266-0010-0154z.
- Chan, B. P. e Leong, K. W. (2008). Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J.* Springer. Doi:10.1007/s00586-008-0745-3.
- Chen, Y.-K., Huang, A. H.-C., Chan, A. W.-S., Shieh, T.-Y. e Lin, L.-M. (2011). Human dental pulp stem cells derived from different cryopreservation methods of human dental pulp tissues of diseased teeth. *Journal of Oral Pathology & Medicine.* J Oral Pathol Me, 2011, 40:793-800. Doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01040.x.

- Choi, Y.-A., Seol, M.-Y., Shin, H.-I. e Park, E. (2014). Bobby Sox homology regulates odontoblast differentiation of human dental pulp stem cells/progenitors. *Cell Communication and Signaling*. Disponível em: <http://www.bioignaling.com/content/12/1/35>.
- Cordeiro, M. M., Dong, Z., Kaneko, T., Zhang, Z., Miyazawa, M., Shi S., Smith, A. J. e Nor, J. E. (2008). Dental Pulp Tissue Engineering with Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *J Endod*, 34:962-969, Volume 34, Number 8. American Association of Endodontics. Doi:10.1016/j.joen.2008.04.009.
- Coppe, C., Zhang, Y., Besten D. e Pamela, K. (2009). Characterization of Primary Dental Pulp Cells In Vitro. *Pediatric Dentistry*, 467-471, Volume 31, Number 7, December 2009. American Academy of Pediatric Dentistry.
- Demarco, F. F., Casagrande, L., Zhang, Z., Dong, Z., Tarquinio, S. B., Zeitlin, B. D., Shi, S., Smith, A. J. e Nor, J. E. (2010). Effects of Morphogen and Scaffold Porogen on the Differentiation of dental Pulp Stem Cells. *J Endod*, Volume 36, Number 11. American Association of Endodontics. Elsevier Inc. Doi:10.1016/j.joen.2010.08.031.
- Demarco, F.F., Conde, M.C.M., Cavalcanti, B., Casagrande, L., Sakai, V. e Nor, J.E. (2011). Dental pulp tissue engineering. *Braz Dent J*, 2011; 22(1):3-13.
- DiPietro, L. (2012). Oral Stem Cells: The Fountain of Youth for Epithelialization and Wound Therapy? *Wound Healing Society*. Advances in wound care, Volume 3, Number 7. Doi:10.1089/wound.2012.0421.
- Edalat, F., Bae, H., Manoucheri, S., Cha, J. e Khademhosseini, A. (2012). Engineering Approaches Toward Deconstructing and Controlling the Stem Cell Environment. *Ann Biomed Eng*. 2012, June, 40(6):1301-1315. Doi:10.1007/s10439-011-0452-9.
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I. e Akiyama, K. (2012). Stem cells in dentistry – Part I: Stem cell sources. *Journal of Prosthodontic Research*. 56 (2012) 151-165. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.06.001>.
- Egusa, H., Sonoyama, W., Nishimura, M., Atsuta, I. e Akiyama, K. (2012). Stem cells in dentistry – Part II: Clinical applications. *Journal of Prosthodontic Research*. 56

- (2012) 229-248. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpor.2012.10.001>.
- Feng, R. e Lengner, C. (2012). Application of Stem Cell Techonoly in Dental Regenerative Medicine. *Advances In Wound Care*. Volume 2, Number 6. Doi:10.1089/wound.2012.0375.
- Gronthos, S., Mankani, M., Brahimi, J., Robey, P. e Shi, S. (2000). Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Doi:10.1073/pnas.240309797. Disponível em: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.240309797.
- Hacking, S. A. e Khademhosseini, A. (2009). Applications of Microscale Technologies for Regenerative Dentistry. Critical Reviews In Oral Biology & Medicine. *J Dent Res*, 88(5):409-421.
- Han, N., Zheng, Y., Li, R., Li, X., Zhou, M., Niu, Y. e Zhang, Q. (2014). β -Catenin Enhances Odontoblastic Differentiation of Dental Pulp Cells through Activation of Runx2. *Plos One*, Volume 9, Issue 2, e88890.
- Hara, K., Yamada, Y., Nakamura, S., Umemura, E., Ito, K. e Ueda, M. (2011). Potential Characteristics of Stem Cells from Human Exfoliated Deciduous Teeth Compared with Bone Marrow-derived Mesenchymal Stem Cells for Mineralized Tissue-forming Cell Biology. *J Endod*, 37:1647-1652, Volume 37, Number 12. Doi:10.1016/j.joen.2011.08.023.
- Horibe, H., Murakami, M., Iohara, K., Hayashi, Y., Takeuchi, N., Takei, I., Kurita, K. e Nakashima, M. (2014). Isolation of a Stable Subpopulation of Mobilized Dental Pulp Stem Cells (MDPSCs) with High Proliferation, Migration, and Regeneration Potential Is Independent of Age. *Plos One*, Volume 9, Issue 5, e98553.
- Huang, A., Chen, Y.-K., Chan, A. W.-S., Schieh, T.-Y. e Lin, L.-M. (2009). Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Stem/Stromal Cells From Nonextracted Crown-fractured Teeth Requiring Root Canal Therapy. *J Endod*, 35:673-681, Volume 35, Number 5. American Association of Endodontics. Doi:10.1016/j.joen.2009.01.019.

- Huang, G. T.-J., Yamaza, T., Shea, L. D., Djouad, F., Kuhn, N. Z., Tuan, R. S. e Shi, S. (2010). Stem/Progenitor Cell-Mediated De Novo Regeneration of Dental Pulp with Newly Deposited Continuous Layer of Dentin in an In Vivo Model. *Tissue Engeneering: Part A*, Volume 16, Number 2, 2010. Doi:10.1089/ten.tea.2009.0518.
- Iohara, K., Murakami, M., Takeuchi, N., Osako, Y., Ito, M., Ishizaka, R., Utunomiya, S., Nakamura, H., Matsushita, K. e Nakashima, M. (2013). A Novel Combinatorial Therapy With Pulp Stem Cells and Granulocyte Colony-Stimulating Factor for Total Pulp Regeneration. *Stem Cells Translational Medicine*. 2013, 2:521-533. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2012-0132>.
- Kawashima, N. (2012). Characterisation of dental pulp stem cells: A new horizon for tissue regeneration? *Oral Biology*, 57, 1439-1458. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.08.010>.
- Kodonas, K., Gogos, C., Papadimitriou, S., Kouzi-Koliakou, K. e Tziafas, D. (2012). Experimental Formation of Dentin-like Structure in The Root Canal Implant Model Using Cryopreserved Swine Dental Pulp Progenitor Cells. *J Endod*, 38:913-919, Volume 38, Number 7. American Association of Endodontics. Doi:10.1016/j.joen.2012.02.005.
- La Noce, M., Paino, F., Spina, A., Naddeo, P., Montella, R., Desiderio, V., De Rosa, A., Papaccio, G., Tirino, V. e Laino, L. (2014). Dental pulp stem cells: State of the art and suggestions for a true translation of research into therapy. *Journal of Dentistry*. 42 (2014) 761-768. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jdent.2014.02.018>.
- Lodish, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky e Darnell. (2005). *Biologia Celular e Molecular*, 5ª ed. Artmed. ISBN 85-363-0535-5. Porto Alegre, RS, Brasil. Pág. 233, 896-901.
- Ma, L., Makino, Y., Yamaza, H., Akiyama, K., Hoshino, Y., Song, G., Kukita, T., Nonaka, K., Shi, S. e Yamaza, T. (2012). Cryopreserved dental pulp tissues of exfoliated deciduous teeth is a feasible stem cell resource for regenerative medicine. *Plos One*, December 2012, Volume 7, Issue 12, e51777.

- Machado, E., Fernandes, M. H. e Gomes, P. S. (2012). Dental Stem Cells for Craniofacial Tissue Engineering. *Oral Surg Oral Med Pathol Oral Radiol*, Vol.113, No. 6. Elsevier Inc. Doi:10.1016/j.tripleo.2011.05.039.
- Masthan, K. M. K., Sankari, S., Babu, N. e Gopalakrishnan, T. (2013). Mystery Inside The Tooth: The Dental Pulp Stem Cells. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. 2013 May, Vol-7(5):945-947. Doi:10.7860/JCDR/2013/5379.2984.
- Miura, M., Gronthos, S., Zhao, M., Lu, Bai., Fisher, L., Robey, P. e Shi, S. (2003). SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *PNAS*. May 13, 2003, Volume 100, Number 10. 5807–5812. Disponível em: www.pnas.org/cgi_doi_10.1073_pnas.0937635100.
- Nakahara, T. (2011). Potential feasibility of dental stem cells for regenerative therapies: stem cell transplantation and whole-tooth engineering. *Odontology* (2011) 99:105-111. Doi: 10.1007/s10266-011-0037-y.
- Nakamura, S., Yamada, Y., Katagiri, W., Sugito, T., Ito, K. e Ueda, M. (2009). Stem Cell Proliferation Pathways Comparison between Human Exfoliated Deciduous Teeth and Dental Pulp Stem Cells by Gene Expression Profile from Promising Dental Pulp. Doi:10.1016/j.joen.2009.07.024.
- Nakashima, M. e Iohara, K. (2011). Regeneration of Dental Pulp by Stem Cells. *Adv Dent Res*, 23(3):313-319. Doi:10.1177/0022034511405323.
- Otsu, K., Kumakami-Sakano, M., Fujiwara, N., Kikuchi, K., Keller, L., Lesot, H. e Harada, H. (2014). Stem cell sources for tooth regeneration: current status and future prospects. *Frontiers in Physiology*. February 2014, Volume 5, Article 36. Doi:10.3389/fphys.2014.00036.
- Rai, S., Kaur, M. e Kaur, S. (2013). Applications of Stem Cells in Interdisciplinary Dentistry and Beyond: An Overview. *Ann Med Health Sci Res*. 3(2):245-254. Doi:10.4103/2141-9248.113670.
- Rodríguez-Lozano, F.-J., Insausti, C.-L., Iniesta, F., Blanquer, M., Ramírez, M.-C., Meseguer, L., Meseguer-Henarejos, A.-B., Marín, N., Martínez, S. e Moraleda, J.-M. (2012). Mesenchymal dental stem cells in regenerative dentistry. *Med Oral Patol Oral*

- Cir Bucal*, 17 (6):e1062-7. Doi:10.4317/medoral.17925. Disponível em: <http://dx.doi.org/doi:10.4317/medoral.17925>.
- Rosa, V., Zhang, Z., Grande, R. H. M. e Nor, J. (2013). Dental Pulp Tissue Engineering in Full-length Human Root Canals. *J Dental Research*. 92(11):970-975, 2013. Doi:10.1177/0022034513505772.
- Rosa, V., Botero T. M. e Nor, J. (2011). Regenerative Endodontics in light of the stem cell paradigm. *Int Dent J.*, 2011 August; 61(01):23-28. Doi:10.1111/j.1875-595X.2011.00026.x.
- Rosa, V., Bona, A., Cavalcanti, B. e Nor, J. (2011). Tissue engineering: From research to dental clinics. *Dental Materials*, 28, 341-348. Elsevier. Doi:10.1016/j.dental.2011.11.025.
- Sharma, S., Srivastava, D., Grover, S. e Sharma, V. (2014). Biomaterials in Tooth Tissue Engineering: A Review. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*. Doi:10.7860/JCDR/2014/7609.3937. Disponível em: http://www.jcdr.net/back_issues.asp.
- Shi, S., Bartold, P., Miura, M., Seo, B., Robey P. e Gronthos, S. (2005). The efficacy of mesenchymal stem cells to regenerate and repair dental structures. *Orthod Craniofacial Res*, 8, 2005; 191-199.
- Shilpa, P. S., Kaul, R., Sultana, N. e Bhat, S. (2013). Stem Cells: Boon to dentistry and medicine. *Dent Res J*. 10(2):149-154.
- Singh, K., Mishra, N., Kumar, L., Agarwal, K., e Agarwal., B. (2012). Role of stem cells in tooth bioengineering. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*. Volume 2, Number 1, 41-45. Doi:10.1016/S2212-4268(12)60010-4.
- Summitt, J., Robbins, J., Hilton, T. e Schwartz, R. (2006). *Fundamentals of Operative Dentistry, A Contemporary Approach*. 3th ed. ISBN 0-86715-452-7. Hanover Park, Illinois. Pág. 21-25.
- Suzuki, T., Lee, C., Chen, M., Zhao, W., Fu, S., Qi, J., Chatkowski, G., Eisig, S., Wong, A. e Mao, J. (2011). Induced Migration of Dental Pulp Stem Cells for in vivo Pulp

- Regeneration. *J Dent Res*. International & American Associations for Dental Research. Doi:10.1177/0022034511408426.
- Ueda, M., Fujisawa, T., Ono, M., Hara, E., Pahm, H., Nakajima, R., Sonoyama, W. e Kuboki, T. (2014). A short-term treatment with tumor necrosis factor-alpha enhances stem cell phenotype of human dental pulp cells. *Stem Cell Research & Therapy*. BioMed Central. Disponível em: <http://stemcellres.com/content/5/1/31>.
- Vallone, V., Romaniuk, M. A., Choi, H., Labovsky, V., Otaegui, J. e Chasseing, N. (2012). Mesenchymal stem cells and their use in therapy: What has been achieved?. *International Society of Differentiation*. Elsevier. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.diff.2012.08.004>.
- Volponi, A., Pang, Y. e Ssharpe, P. (2010). Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in Cell Biology*, Vol. 20, No. 12. Elsevier. Doi:10.1016/j.tcb.2010.09.012.
- Wang, J., Liu, X., Jin, X., Ma, H., Hu, J., Ni, L. e Ma, P. (2010). The odontogenic differentiation of human dental pulp stem cells on nanofibrous poly(L-lactic acid) scaffolds *in vitro* and *in vivo*. *Acta Biomater*. 2010 October; 6(10):. Doi:10.1016/j.actbio.2010.04.009.
- Wang, X., Sha, X.-J., Li, G.-H., Yang, F.-S., Ji, K., Wen, L.-Y., Liu, S.-Y., Chen, L., Ding, Y. e Xuan, K. (2012). Comparative characterization of stem cells from human exfoliated deciduous teeth and dental pulp stem cells. *Oral Biology*, 57, 1231-1240. Elsevier Ltd. Doi:10.1016/j.archoralbio.2012.02.014.
- Wang, Y., Zhao, Y., Jia, W., Yang, J. e Ge, L. (2013). Preliminary Study on Dental Pulp Stem Cell-mediated Pulp Regeneration in Canine Immature Permanent Teeth. *J Endod*, Volume 39, Number 2. American Association of Endodontics.
- Yan, M., Yu, Y., Zhang, G., Tang C. e Yu, J. (2011). A Journey from Dental Pulp Stem Cells to a Bio-tooth. *Stem Cell Rev and Rep*, 2011, 7:161-171. Doi: 10.1007/s12015-010-9155-0.
- Yildirim, S., Fu, S., Kim, K., Zhou, H., Lee, C., Li, A., Kim, S., Wang, S. e Mao, J. (2011). Tooth regeneration: a revolution in stomatology and evolution in regenerative medicine. *International Journal of Oral Science*. 3:107-116. Doi:10.4248/IJOS11042.

- Yu, S., Diao, S., Wang, J., Ding, G., Yang, D. e Fan, Z. (2014). Comparative Analysis of Proliferation and Differentiation Potentials of Stem Cells from Inflamed Pulp of Deciduous Teeth and Stem Cells from Exfoliated Deciduous Teeth. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation. Volume 24. Article ID 930907. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/930907>.
- Zhang, W., Ahluwalia, I., Litterman, R., Kaplan, D. e Yelick, P. (2011). Human dental pulp progenitor cell behavior on aqueous and hexafluoroisopropanol (HFIP) based silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2011 June, 97(4):414-422. Doi:10.1002/jbm.a.33062.
- Zheng, Y., Wang, X., Wang, Y., Liu, X., Zhang, C., Hou, B. e Wang, S. (2012). Dentin Regeneration Using Deciduous Pulp Stem/Progenitor Cells. *J Dent Res*. 91(7):676-682. Doi:10.1177/0022034512449834.
- Zhou, Y., Fan, W. e Xiao, Y. (2014). The Effect of Hypoxia on the Stemness and Differentiation Capacity of PDLA and DPC. *BioMed Research International*. Hindawi Publishing Corporation. Volume 2014. Article ID 890675. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/890675>.
- <http://akshaylaserdentalcare.com/dental-stem-cell> (Dental Stem Cell Preservation, 2010).
- <http://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/713959.fig.001.jpg> (Adipose-Derived Stem Cells in Tissue Regeneration: A Review, 2012)
- <http://www.pall.com/main/medical/frequently-asked-questions-cell-therapy-38848.page> (Frequently Asked Questions: Cell Therapy and Regenerative Medicine)
- http://www.tankonyvtar.hu/en/tartalom/tamop425/0011_1A_3D_en_book/ch01s02.html (Three dimensional tissue cultures and tissue engineering, 2011).
- http://www.who.int/oral_health/disease_burden/global/en/ (What is the burden of oral disease?, 2014).